

Aus dem Bereich der Neurologie
Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Die Rolle der neuronalen p38 α Mitogen-aktivierten Proteinkinase in der Alzheimer-Krankheit

Dissertation

***zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaft
der Medizinischen Fakultät***

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von:

Laura Schnöder
geb. am: 15.07.1988 in Pirmasens

„Das, was aus Bestandteilen so zusammengesetzt ist, dass es ein einheitliches Ganzes bildet – nicht nach Art eines Haufens, sondern wie eine Silbe –, das ist offenbar mehr als bloß die Summe seiner Bestandteile“

-Aristoteles

I Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	6
Abstract	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Die Alzheimer-Krankheit	10
1.2 Amyloidogenes Vorläuferprotein und A β	13
1.2.1 Das β -site of APP cleaving enzyme BACE	15
1.2.1.1 Klassifikation von BACE	15
1.2.1.2 Post-translationale Modifikationen an BACE.....	16
1.3 Tau.....	18
1.4 AD und Mikroglia vermittelte Neuroinflammation	18
1.5 Autophagie.....	19
1.6 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38	20
1.6.1 Klassifikation der p38-MAPK.....	20
1.6.2 Aktivierung der p38-MAPK.....	21
1.6.3 Rolle der aktivierten p38-MAPK in AD	23
1.7 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methodik	26
2.1 Material	26
2.1.1 Arbeitsmaterialien.....	26
2.1.2 Bereitgestellte Zelllinien	33
2.1.3 Transfektionsvektoren	34
2.1.4 Bakterien, Kulturmedien und Selektionsantibiotika	34
2.1.5 Oligonukleotide.....	35
2.1.6 Versuchstiere	35
2.1.6.1 p38 α -MAPK Deletion im AD-Modell der Plaqueformation	36
2.1.6.2 ATG5-Mausmodell.....	37
2.1.6.3 p38 α -MAPK Deletion im AD-Modell der Fibrillenformation	38
2.2 Analysen <i>in vitro</i>	38
2.2.1 Konstruktion der p38 α -MAPK kd Zelllinie.....	38
2.2.1.1 Generation der doppelsträngigen Oligonukleotide und Ligation	39
2.2.1.2 Transformation in E.coli.....	39
2.2.1.3 Kontrolle der Plasmidsequenz nach Minipräparation	40
2.2.1.4 Plasmidvervielfältigung und Maxipräparation.....	41
2.2.2 Kultivierung von Zelllinien	41
2.2.2.1 Kultivierte Zelllinien.....	41
2.2.3 Transfektion mit Lipofectamine 2000	42
2.2.4 CRISPR-Cas9-Technik	43
2.2.4.1 Anreicherung der transfizierten Zellen über CD4 Dynabeads.....	45
2.2.4.2 Durchflusszytometrische Färbung.....	47

2.2.5	Isolation der zellulären Membranfraktion	48
2.2.6	Ernten der Zellen für immunologischen Proteinnachweis	49
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.2.8	Aktivitätsmessung der β - und γ -Sekretase	50
2.2.9	Gelelektrophorese	50
2.2.10	Proteintransfer mittels <i>Western blot</i>	51
2.2.11	Immunologische Proteindetektion	52
2.2.12	Präparation der lysosomalen Fraktion	53
2.2.13	Co-Immunopräzipitation	54
2.2.13.1	BACE <i>pull down</i>	54
2.2.13.2	Threonin <i>pull down</i>	56
2.2.14	Quantitative Real-Time PCR	56
2.2.14.1	RNA-Isolation	57
2.2.14.2	Reverse Transkription	58
2.2.14.3	qRT-PCR mittels SYBR Green	58
2.2.14.4	qRT-PCR mittels TaqMan Probe	59
2.2.15	Immunzytochemie	60
2.2.15.1	Behandlung der LC3-GFP-RFP Zellen mit p38-MAPK Inhibitor	60
2.2.15.2	BACE und Autophagievakuolen	60
2.2.16	Primärkultur von embryonalen Neuronen	61
2.3	Analysen in vivo	62
2.3.1	Wasserlabyrinth nach Morris	62
2.3.2	Sektion der Versuchstiere und Probengewinnung	63
2.3.3	IHC	64
2.3.3.1	Immunhistochemische Färbung von p38-MAPK	64
2.3.3.2	Immunhistochemische Färbung von A β	65
2.3.3.3	Immunhistochemische Färbung der Mikroglia	67
2.3.3.4	Apoptose Nachweis mittels TUNEL-Färbung	67
2.3.4	Isolation der Membranfraktion und Sekretasen-Aktivitätsmessung	68
2.3.5	Präparation von Hirnhomogenaten	68
2.3.6	Präparation der Tau Fraktionen	69
2.3.7	Immunologischer Nachweis von Tau	69
2.3.8	Immunologischer Nachweis von A β	70
2.4	Statistik	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Deletion der neuronalen p38 α -MAPK in APP/PS1 ^{tg} Mäusen	71
3.2	Deletion von p38 α -MAPK reduziert den zerebralen A β -Gehalt	73
3.3	Deletion von p38 α -MAPK reduziert Aktivität und Proteinlevel von BACE	74
3.4	p38 α -MAPK kd in SHSY5Y Zellen reduziert BACE Aktivität und Proteinmenge	77
3.5	p38 α -MAPK kd beschleunigt Degradation von BACE	79
3.6	p38 α -MAPK kd hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von BACE	81
3.7	Reduktion von p38 α -MAPK verstärkt Autophagie im Zell- und im Mausmodell	82

3.8	Inhibition der Autophagie verhindert BACE Reduktion nach p38 α -MAPK kd	84
3.9	Verbesserte kognitive Leistung nach p38 α -MAPK Deletion	86
3.10	Deletion von p38 α -MAPK verbessert die synaptische Integrität	88
3.11	Keine erhöhte Apoptose nach Deletion von p38 α -MAPK	89
3.12	Deletion von p38 α -MAPK erhöht Wachstumsfaktoren und reduziert Inflammation ..	91
3.13	Effekt der Autophagieinhibition auf BACE in ATG5 ko Mäusen	92
3.13.1	Unverändertes BACE Proteinlevel und Aktivität im Hirnhomogenat	92
3.13.2	Negative Korrelation von BACE und ATG5 Proteinlevel in isolierten Neuronen	94
3.14	p38 α -MAPK kd reduziert BACE Glykosylierung und MGAT3 Phosphorylierung	95
3.15	MGAT3 kd mittels CRISPR/Cas9-Methode reduziert BACE Proteinmenge	97
3.16	MGAT3 kd hebt die Reduktion des BACE Proteinlevels nach p38 α -MAPK kd auf...	99
3.17	Inhibition der Autophagie nach MGAT3 kd erhöht BACE Proteinlevel	100
3.18	Verbesserte kognitive Leistung nach p38 α -MAPK Deletion in Tau ^{tg} Mäusen	101
3.19	Deletion von p38 α -MAPK verbessert die synaptische Integrität in Tau ^{tg} Mäusen ..	102
3.20	Deletion von p38 α -MAPK reduziert Proteinmenge von pTau in Tau ^{tg} Mäusen	103
4	Diskussion	105
4.1	Modellsysteme und Versuchsgruppen	105
4.2	Stand der Forschung und Hypothesenentwicklung	106
4.3	Diskussion der Ergebnisse	107
4.4	Fazit und Ausblick	114
5	Literaturverzeichnis	119
6	Abbildungsverzeichnis	137
7	Tabellenverzeichnis	138
8	Kooperationen	139
9	Abkürzungsverzeichnis	140
10	Danksagung	143
11	Anhang	144
11.1	Mikroskopische Kontrolle der p38 α -MAPK Transfektion	144
11.2	Mikroskopische Kontrolle der MGAT3 Transfektion	144
	Eidesstattliche Erklärung	146

Zusammenfassung

Die Rolle der neuronalen p38 α -Mitogen-aktivierten Proteinkinase in der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung und Hauptursache für Demenz. Bis heute gibt es keine Medikation, um die Patienten in einer stetig alternden Gesellschaft zu heilen. Das Amyloid beta Peptid (A β) gilt als Schlüsselmolekül der Alzheimer-Pathogenese und Initiator der Tau-Ablagerungen. A β wird von den Enzymen β - und γ -Sekretase synthetisiert und lagert sich im Gehirn zu neurotoxische Plaques ab. Dies resultiert im Absterben der Nervenzellen, was wiederum zu typischen klinischen Symptomen wie Gedächtnisverlust und kognitiven Defiziten führen kann. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38-MAPK) wird mit dem entzündungsauslösenden A β sowie hyperphosphoryliertem Tau in Verbindung gebracht. Eine erhöhte Menge an p38-MAPK wurde zusammen mit A β -Plaques in humanem Alzheimergewebe gefunden und in *vitro* Studien belegen, dass eine Inhibition von p38-MAPK das A β -induzierte Absterben der Nervenzellen verringert. Von größtem Interesse ist es daher, die Auswirkung einer p38-MAPK Inhibition auf die Alzheimer-Pathogenese zu untersuchen. Durch diese essentielle Forschung werden Informationen über das Zusammenspiel von A β -Synthese und p38-MAPK gewonnen, wodurch neue Therapieansätze entwickelt werden können. In der hier vorgestellten Studie wurde das, im Hirn stark exprimierte, α -Isoform der p38-MAPK in SHSY5Y Zellen sowie in Neuronen von APP/PS1^{tg} Mäusen pharmakologisch bzw. genetisch reduziert. Nach dieser Reduktion, konnte sowohl in *vitro* als auch in *vivo*, mittels Immunhistochemie sowie quantitativem *Western blot* und Fluoreszenzbasierter Enzymaktivitätsmessungen festgestellt werden, dass sich der A β -Gehalt, sowie das Proteinlevel und die Enzymaktivität von BACE signifikant verringern und gleichzeitig die Autophagie erhöht wird. Des Weiteren zeigen in *vitro* Experimente, dass nach Transfektion von SHSY5Y Zellen mit dem p38 α -MAPK *knock down* Konstrukt, BACE schneller über den lysosomalen Degradationsweg abgebaut wird. Kontrollexperimente mit neuronalen Primärkulturen belegen, dass die BACE Degradation durch das Autophagie-assoziierte Gen 5 (ATG5) vermittelt ist und der Effekt einer p38 α -MAPK Reduktion nach ATG5 Inhibition wird partiell aufgehoben. Analysen mittels qRT-PCR in *vitro* und in

vivo, zeigen hingegen keine reduzierte Genexpression von BACE nach Deletion von p38 α -MAPK. Dies lässt auf post-transkriptionale Modifikationen an BACE nach p38 α -MAPK Reduktion schließen. Eine post-translationale Modifikation an Serin über Phosphorylierung durch p38 α -MAPK konnte nach Co-Immuno-präzipitation im BACE Zelllysats ausgeschlossen werden. Allerdings nimmt die p38 α -MAPK über Phosphorylierung von MGAT3, einer N-acetylglucosaminyltransferase-3, an Threonin indirekt Einfluss auf den Glykosylierungsstatus von BACE. In *vivo*-Studien (Kizuka et al., 2015a; Kizuka et al., 2016) belegen bei verminderter MGAT3 Aktivität, eine instabile Form von BACE und Degradation in Lysosomen. Mittels der CRISPR-Cas9 *gene editing* Technologie wurde die MGAT3 Expression in SHSY5Y Zellen über liposomale Transfektion reduziert und die Effizienz nach durchflusszytometrischer Analysen ermittelt. Übereinstimmend mit aktuellen Studien, reduziert der MGAT3 *knock down* ebenfalls den Proteingehalt von BACE. Zusätzlich wurde in diesen Zellen p38 α -MAPK deletiert. Quantitative *Western blot* Analysen zeigen, einen von p38 α -MAPK-dosisabhängigen Umkehreffekt in den MGAT3 *knock down* Zellen, welcher in erhöhtem BACE Proteinlevel resultiert. Um den Phänotyp der Alzheimer-Krankheit zu vervollständigen wurde der Effekt einer genetischen p38 α -MAPK Deletion in 9 Monaten alten APP/PS1^{tg} und Tau^{tg} Mäusen auf Gedächtnis- und Lernprozesse mittels *Morris water maze* überprüft. Eine homozygote p38 α -MAPK Deletion konnte die Lern- und Gedächtnisleistung, sowie die synaptische Integrität signifikant verbessern. Nach Anwendung einer TUNEL-Färbung konnte erhöhte Apoptose als Nebeneffekt ausgeschlossen werden. Zudem konnte mittels qRT-PCR ein erhöhtes Expressionsprofil von Wachstumsfaktoren bei gleichzeitiger Reduktion der proinflammatorischen Zytokine wie TNF- α mit assoziierter Reduktion von Mikroglia gezeigt werden. Zusammenfassend wirkt sich eine p38 α -MAPK Reduktion positiv auf die A β und Tau-induzierte Alzheimer-Pathogenese aus. Als molekularer Mechanismus wurde, neben der gesteigerten Autophagie und der damit verbundenen BACE Degradation, die indirekte Beeinflussung von p38 α -MAPK auf die Glykosylierung von BACE, über Phosphorylierung des zuständigen Glykoproteins MGAT3, und die dadurch resultierende Instabilisierung identifiziert. Daher scheint eine spezifische Inhibition von p38 α -MAPK als neue klinische Alzheimer-Therapie erfolgversprechend.

Abstract**Pathogenic role of neuronal p38 α mitogen activated protein kinase in Alzheimer's disease**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease and main cause of dementia. Until today, there is no efficient therapy to cure the patients of a continuously altering population. The amyloid beta peptide (A β) is a key molecule in Alzheimer's pathogenesis and initiates aggregation of hyperphosphorylated tau. A β is produced by cleavage of two enzymes, the β - and γ -secretase and accumulates in the brain to toxic plaques. This results in neurodegeneration, which in turn leads to Alzheimer's disease typical symptoms like deficits in memory and cognitive function. The mitogen activated protein kinase p38 (p38-MAPK) is associated with neuroinflammatory A β and hyperphosphorylated tau. Increased amount of p38-MAPK was observed in human Alzheimer's disease brain together with A β plaques and in *vitro* studies showed a reduction of A β induced neuronal death after inhibition of p38-MAPK. Therefore the examination of the influence of p38-MAPK inhibition, on the Alzheimer's disease pathogenesis is of major interest. Thus new information about the interaction between p38-MAPK and the synthesis of A β can help to create new therapeutic strategies for Alzheimer's disease patients. To gain insight in this research topic, this presented study was performed. The α isoform of p38-MAPK is highly expressed in brain, therefore we reduced the expression level of p38 α -MAPK in SHSY5Y cells and in neurons of APP/PS1^{tg} mice, by a pharmacological and a genetical approach, respectively. After this reduction a significant reduced A β load and protein level and activity of BACE was observed in *vitro* and in *vivo* after performance of immunohistochemistry, quantitative Western blot and fluorescence based enzyme activity measurements. Simultaneously, autophagy was enhanced in both systems. Moreover, in *vitro* experiments showed facilitated lysosomal BACE degradation, after transfection of SHSY5Y cells with the p38 α -MAPK knock down construct. Control experiments verified that BACE degradation is mediated by autophagy related gene 5 (ATG5) and inhibition of ATG5 partially abolished the effect of p38 α -MAPK reduction regarding the protein level of BACE. In contrast, no decrease of BACE gene transcription was observed after reduction of p38 α -MAPK in *vitro* und in *vivo* by performing qRT-PCR analysis. These results indi-

cated that post translational modifications on BACE occur after p38 α -MAPK reduction, although the phosphorylation at serine by p38 α -MAPK could be excluded as post transcriptional modification after co-immunoprecipitation analysis in the BACE pull down lysate. However, by phosphorylation of the N-acetylglucosaminyltransferase-3 (MGAT3) at threonine, p38 α -MAPK can indirectly influence the glycosylation level of BACE. Other studies provide evidence, that without glycosylation, BACE shows an instable form and will be degraded by the lysosomal pathway (Kizuka et al., 2015a; Kizuka et al., 2016). Applying the new gene editing technique of CRISPR-Cas9, MGAT3 expression was reduced by liposomal transfection, in SHSY5Y cells. The transfection efficiency was verified by flow cytometric analysis. In line with recent studies, these MGAT3 knock down cells also showed reduced BACE protein level. In addition these cells were transfected with the construct for p38 α -MAPK knock down. Quantitative Western blot analysis showed a rescue effect of reduced BACE protein level after p38 α -MAPK reduction in MGAT3 knock down cells, which leads to increased BACE protein level. In order to complete the human Alzheimer's disease phenotype with A β and hyperphosphorylated tau, the cognitive performance of nine month old APP/PS1^{tg} and Tau^{tg} mice, was analyzed by Morris water maze test after p38 α -MAPK deletion respectively. Homozygote deletion of p38 α -MAPK could improve learning and memory function and also the synaptic integrity was significant improved, in brain homogenates of these animals. Side effects like enhanced apoptosis after p38 α -MAPK deletion could be excluded by quantitative Western blot and TUNEL assay. In addition, a higher gene expression profile of growth factors in accordance with reduced gene expression profiles of pro inflammatory cytokines like TNF- α and reduced number of microglia could be detected after p38 α -MAPK knock out. In conclusion this study shows that a p38 α -MAPK reduction acts positively on A β and tau induced Alzheimer's disease pathogenesis. Beside facilitated BACE degradation due to increased autophagy, the indirect influence of p38 α -MAPK at glycosylation of BACE, by phosphorylation of the regarding glycoprotein MGAT3 and the resulting enhanced destabilization of BACE could be identified as underlying molecular mechanism. Therefore, a specific inhibition of p38 α -MAPK is a promising target for new Alzheimer's disease treatments.

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (eng. *Alzheimer's disease*, AD) gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen und ist mit 60-80 % die häufigste Form der Demenz (Association, 2015). In Deutschland erkranken ca. 300 000 Menschen jährlich an dieser bisher unheilbaren Krankheit und laut *World Health Organization* wird sich diese Zahl bis 2050 verdreifacht haben (Wortmann, 2012). Neben den klinischen Symptomen wie Stimmungsschwankungen, Apathie, Angstzuständen, Depressionen, Defizite im Erinnerungsvermögen, sowie in räumlicher und zeitlicher Orientierung (Small et al., 1997) dokumentierte schon Alois Alzheimer, der Entdecker und Namensgeber der AD, den „Verlust der Spontansprache“ (Alzheimer, 1911) bei seiner Patientin Auguste Deter. Verlust der Selbstständigkeit und Muskellähmungen treten im späteren Krankheitsstadium auf, was je nach Verlauf, nach 4-7 Jahren zum Tod der Patienten führt, wobei sich männliche und weibliche Patienten nicht unterscheiden (Xie et al., 2008; Querfurth, Laferla, 2010). AD wird in zwei Formen, die *late onset* und in die *early onset* AD unterteilt. Letztere Form wird familiär vererbt und kommt mit ca. 5 % seltener vor (Zhang et al., 2012). Die familiäre AD tritt als Form der *early onset* AD bei jungen Patienten unter 60 Jahren auf und ist auf Genmutationen in presenilin-1 und presenilin-2 (PS1 und 2) sowie auf Mutationen im amyloiden Vorläuferprotein (eng. *amyloid precursor protein*, APP) Gen zurückzuführen (Levy et al., 1990; Goate et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington, 1995). Hingegen ist die häufigere *late onset* Form der AD (95 %), mit Erkrankung ab 60-65 Jahren, multifaktoriell. Neben dem Altern selbst (Ferri et al., 2006), ist eine verstärkte Expression des Apolipoproteins E Hauptrisikofaktor der *late onset* AD (Corder et al., 1993; Raber et al., 2004). Des Weiteren stehen Mutationen in *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM10) (Suh et al., 2013), dem Gen für die α -Sekretase, in dem Sortilin Rezeptor1 (Rogaeva et al., 2007) und einige andere Genmutationen in dem *triggering receptor expressed on myeloid cells-2* und $\alpha 2$ Makroglobulin unter Verdacht AD zu verursachen (Giri et al., 2016). Ebenfalls werden Herz-Kreislauf-

Erkrankungen, Diabetes Mellitus, Bluthochdruck, Hirntraumata, sowie Schlafstörungen als Risikofaktoren diskutiert (Barnes, Yaffe, 2011; Di Marco et al., 2014; Picchioni et al., 2014). Bis die Diagnose der AD getroffen wird, vergehen oft Jahre ohne die erforderliche Medikation. Als Früherkennung dient der Nachweis bestimmter Biomarker im Blut und in der Zerebrospinalflüssigkeit (eng. *cerebrospinal fluid*, CSF), jedoch werden diese meist erst im fortgeschrittenen AD-Stadium detektiert und eine effektive frühzeitige Behandlung der Patienten ist nicht mehr möglich. Der Fortschritt der Erkrankung wird an Hand der Symptomatik in drei Stadien eingeteilt (Abb.1, entnommen aus (Jack et al., 2010)), das präklinische Stadium, das Stadium der leichten kognitiven Störungen (eng. *mild cognitive impairment*, MCI) und das Stadium der Demenz (Albert et al., 2011).

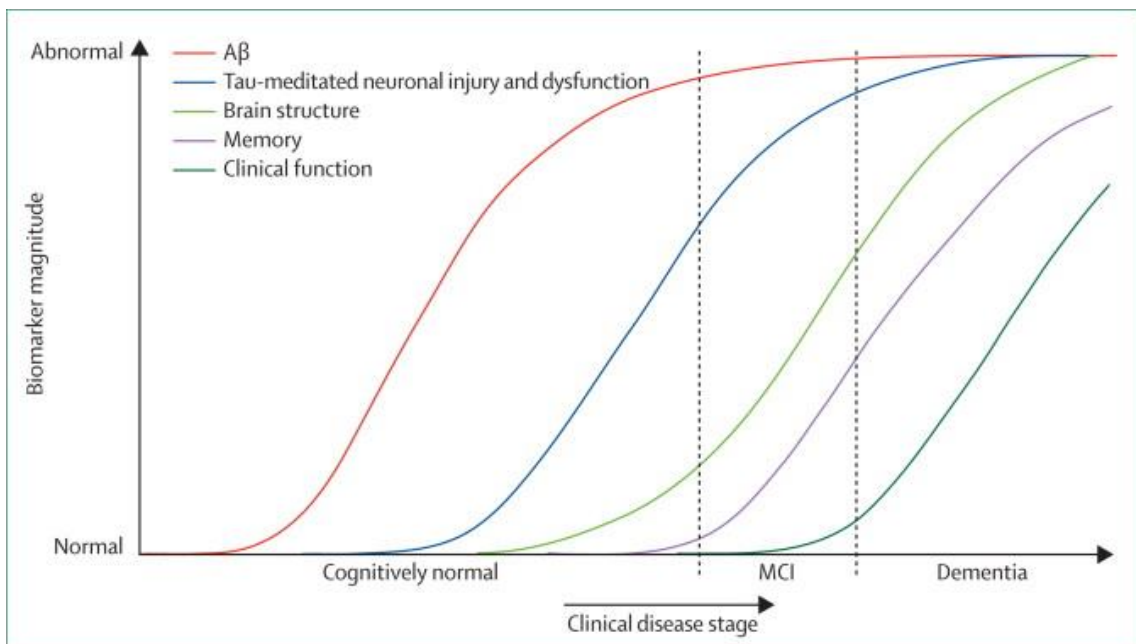


Abbildung 1: Dynamik der Biomarker über den Verlauf der AD-Stadien (entnommen aus (Jack et al., 2010)). Y-Achse: normale bis abnormale Veränderung der Biomarker. Aβ-Messung wird, durch die rote Kurve symbolisiert und beinhaltet CSF Aβ42 oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Die blaue Kurve steht für Tau evozierte neuronale Schädigung und Dysfunktion. Die Messung von Tau erfolgt im CSF oder über PET. Veränderungen der Hirnstruktur werden durch die grüne Kurve repräsentiert. In lila werden Defizite in Gedächtnisfunktion und in dunkelgrün klinische Symptome abgebildet. X-Achse: Progression der AD über die unterschiedlichen Phasen wie der symptomlosen bzw. präklinischen Phase (*cognitively normal*) der Phase der leichten kognitiven Störungen (MCI) bis hin zur Phase der Demenz (*dementia*).

Liegen erhöhte Biomarker bei Ausbleiben von klinischen Symptomen vor, befindet sich der Betroffene im präklinischen Stadium. Defizite in Denk- und Erinnerungsprozessen beschreiben das MCI-Stadium. Im Endstadium der AD, können Patienten unter Muskelversagen leiden, dies geht oft mit dem Verlust der

Selbstständigkeit einher und endet in Pflegebedürftigkeit. Durch bildgebende Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie (MRT), können typische zerebralen Strukturveränderungen wie Hirnatrophie in hippocampalen und corticalen Bereichen, vergrößerte Ventrikel und Abnormitäten im Myelin festgestellt werden. Mikroskopische Veränderungen, wie Anhäufung von A β zu senilen Plaques im Hirnparenchym, oder in zerebralen Blutgefäßen, sowie Anhäufung von hyperphosphoryliertem Tau zu intrazellulären neurofibrillären Bündeln (eng. *neurofibrillary tangles*, NFT) können, ebenso wie die MRT Befunde, Jahrzehnte vor den ersten klinischen Symptomen auftreten und in dem präklinischen und MCI Stadium nachgewiesen werden. Als *in vivo* Biomarker gelten eine verminderte Konzentration an A β 1-42 sowie eine erhöhte Konzentration an Gesamttau und phosphoryliertem Tau (pTau) in der CSF. Diese Nachweismethoden dienen der Sicherung der Diagnose und Auswahl der Medikation nach erstem Anamneseverdacht. Die bisherige AD-Medikation fokussiert sich auf die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und Verzögerung des Krankheitsverlaufs. Beispielsweise ist Acetylcholin ein wichtiger Neurotransmitter im Gehirn und essenziell für Gedächtnis- und Lernprozesse. Das Defizit an Acetylcholin verursacht Absterben der Neuronen und der Hippocampus ist, als Ort der Gedächtnisformation, besonders dadurch betroffen (Perry et al., 1978; Bartus et al., 1982; Terry, Buccafusco, 2003). Daher werden neben N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor Antagonisten, Antidepressiva, Vitamin Substitution, Immunisierung mittels A β , auch Acetylcholinesterase Hemmer in der AD-Therapie eingesetzt (Bird, 2008). Zusätzlich gibt es klinische Studien, die anti-inflammatorische Medikamente gegen die kognitiven Defizite einsetzen (Mcgeer, Mcgeer, 1996; Perry et al., 2003), denn neben den histologischen Charakteristikum wie A β -Ablagerungen und Tau Hyperphosphorylierung, sind aktivierte Mikroglia in postmortalem Hirngewebe von AD-Patienten nachgewiesen und die Mikroglia-induzierte Neuroinflammation nimmt eine wichtige Rolle in der Pathogenese ein (Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1995; Sasaki et al., 1997). Allerdings sind alle geschilderten Therapieansätze im besten Fall symptomlindernd, oft allerdings in der klinischen Anwendung wirklos und AD daher immer noch unheilbar.

1.2 Amyloidogenes Vorläuferprotein und A β

A β ist in der AD-Pathogenese das Schlüsselmolekül und Initiator der Krankheit. A β wird aus seinem amyloidogenen Vorläuferprotein APP synthetisiert. APP ist ein Typ1 Membranprotein mit kurzem intrazellulären C-Terminus und langem extrazellulären N-Terminus. Im gesunden Organismus wird es hauptsächlich von Synapsen exprimiert und ist dort an Neuroplastizität, Formierung von Synapsen und deren Erhalt und Integrität beteiligt (Kamal et al., 2001; Priller et al., 2006; Guo et al., 2012). APP ist ein Mitglied einer Genfamilie zu der die *amyloid precursor-like* Proteine (APLP1 und APLP2) gehören (Wasco et al., 1992). Diese Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und teilen konservierte Strukturdomänen, wobei die A β -Sequenz einzig in APP nachzuweisen ist (Scheuermann et al., 2001; Kaden et al., 2008). APP kann Homo- und Heterodimere mit APLP1 und APLP2 ausbilden und dann Zelladhäsion fördern (Soba et al., 2005). Diese Dimerisation entspricht der Konformationsänderung von Rezeptoren nach Andocken des Liganden, wodurch sich die katalytischen Domänen annähern und die Signaltransduktion vermitteln. Bei der Dimerisation von APP kann es durch seine Spleisvariante A β zur Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden und erhöhter A β -Produktion kommen (Lu et al., 2003). Abhängig von der Sekretase, wird APP innerhalb oder außerhalb der amyloidbildenden Sequenz geschnitten (Abb.2 entnommen aus (Crouch et al., 2008)).

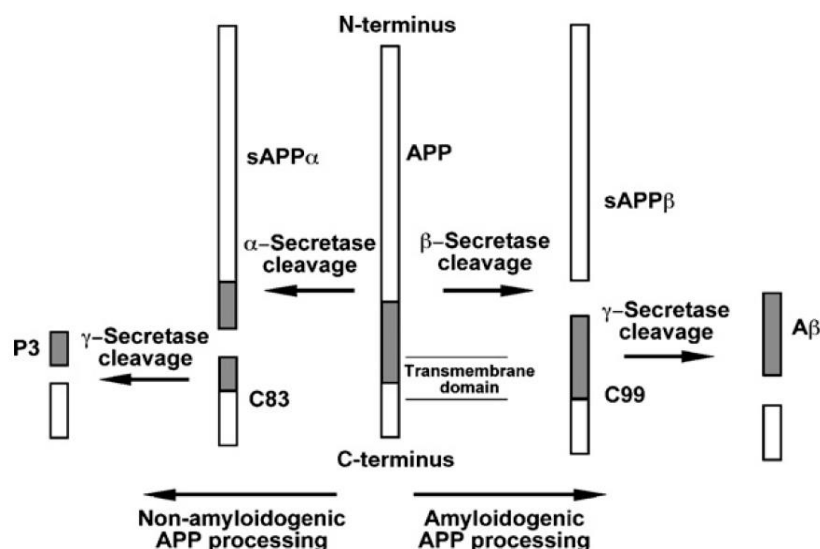


Abbildung 2: Nicht Amyloidogener und amyloidogener Sekretasenweg (entnommen aus (Crouch et al., 2008)). APP wird von α - und γ -Sekretase in sAPP α , C83 und P3 gespalten. Bei der amyloidogenen Prozessierung wird sAPP β nach Schneiden der β -Sekretase von der Transmembrandomäne freigesetzt. Die γ -Sekretase synthetisiert C99 in A β und einen Rest.

Das heißt, APP kann entweder über den nicht amyloidogenen Weg mittels α -Sekretase, in sAPP α und C83, und anschließend mittels γ -Sekretase, in P3 und einen Rest, geschnitten werden. Andererseits kann APP über den amyloidogenen Weg der β -Sekretase in sAPP β und C99 geschnitten werden, wobei das membrangebundene C99 als Substrat der γ -Sekretase in A β prozessiert wird (Haass et al., 2012). A β ist ein unlösliches 4 Kilodalton (kDa) schweres und meist 40-42 Aminosäuren langes Molekül. Die sogenannten A β -Monomere haben womöglich in geringer Konzentration eine protektive Funktion (Plant et al., 2003; Giuffrida et al., 2009) und können mittels Enzymen wie Neprilysin oder Insulin (Turner et al., 2004) abgebaut werden. Bei einem Ungleichgewicht von Synthese und Recycling, lagern sich die Monomere über Zwischenstufen der Dimere und Trimere zu A β -Plaques zusammen, wobei für das längere A β 42 eine stärkere Tendenz zur Akkumulation als für A β 40 nachgewiesen ist und daher für die Neurotoxizität in AD verantwortlich zu sein scheint. Folgen daraus sind Ungleichgewicht der Kalzium-Homöostase (Mark et al., 1995), verminderte mitochondriale Aktivität (Du Yan et al., 1997; Casley et al., 2002; Crouch et al., 2005), Induktion von oxidativem Stress (Opazo et al., 2002), Inflammation durch Aktivierung von Mikrogliazellen und Apoptose (Meda et al., 1995; Sasaki et al., 1997), sowie verminderter Membranintegrität (Lau et al., 2006; Sepulveda et al., 2010). Die synaptotoxischen A β -Plaques akkumulieren um Neurone, rekrutieren Mikroglia und sind für ein pro-inflammatorisches Expressionsprofil in AD maßgeblich. Die Schädigung der Neurone im Neocortex und des limbischen Systems erfolgt also direkt und indirekt durch A β -induzierte Aktivierung der Mikroglia. Diese versammeln sich um die Plaques und sezernieren unterschiedliche neurotoxische inflammatorische Mediatoren. Dazu gehören Zytokine wie der *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und reaktive Sauerstoffspezies (Wyss-Coray, Rogers, 2012). Diese Zusammenhänge von A β -Plaques und AD-Pathogenese werden 1992 von Hardy und Higgins erstmals als Amyloid-Hypothese formuliert (Hardy, Higgins, 1992). Im wesentlichen beschreibt diese, die Formation von neurotoxischen A β -Plaques als Schlüsselement der AD-Pathogenese. Folgende Beobachtungen stützen die Amyloid-Hypothese. Genmutationen, sowie Überexpression des APP selbst, führen zu erhöhter Plaqueformation. Zudem weisen FAD Patienten zuerst A β -Plaques

und erst danach Tau Ablagerungen auf. Des Weiteren sinkt nach Reduktion des Apolipoproteins E auch der A β -Gehalt in AD-Mäusen (Bales et al., 1997) und eine seltene protektive Mutation (A673T) im APP Gen führt zu verminderter A β -Produktion und einem verminderten Risiko an AD zu erkranken (Jonsson et al., 2012). Daher werden seit Jahrzehnten Therapieansätze entwickelt, welche die A β -Synthese hemmen bzw. den A β -Abbau verstärken sollen.

1.2.1 Das β -site of APP cleaving enzyme BACE

1.2.1.1 Klassifikation von BACE

Die *β -site of APP cleaving enzyme* 1 und 2 (BACE1 und BACE2) sind transmembrane Aspartylproteasen. BACE1 ist in den meisten Zellen des Organismus exprimiert, weist allerdings die höchste Expression im zentralen Nervensystem (ZNS) auf und ist bei axonaler Entwicklung, Neurogenese und neuronalen Netzwerkfunktionen beteiligt (Vassar et al., 2014). BACE2 besitzt zwar eine bis zu 64 %ige Aminosäurehomologie zu BACE1, ist hingegen fast ausschließlich in nicht neuronalen Strukturen exprimiert und vermutlich bei der Entstehung von Typ II Diabetes (Esterhazy et al., 2011) sowie in Pigmentation (Rochin et al., 2013) involviert. BACE1 ist die für die A β -Synthese verantwortliche β -Sekretase (Kandalepas et al., 2013) und wird von nun an als BACE bezeichnet. BACE ist im AD-Hirn verstärkt exprimiert und hauptsächlich in Endosomen prozessiert es, durch Schneiden an Asparagin und Glutamin der A β -Sequenz, APP in C99 (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Hussain et al., 2007). C99 wird von der γ -Sekretase, einem Komplex aus PS1 oder PS2, dem Stabilisationfaktor *anterior pharynx defective* 1, dem PS *enhancer* 2 und Nicastatin (zusammengefasst in (De Strooper, Annaert, 2010; De Strooper et al., 2010)), in A β gespalten. BACE initiiert also den amyloidogenen Weg und gilt daher als Antrieb der neurotoxischen A β -Kaskade. Überexpression oder Hemmung des Enzyms führen zu erhöhtem bzw. vermindertem Gehalt an sAPP β , C99, und A β (Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Bodendorf et al., 2002). Studien an BACE *knock-out* (ko) Mäusen (Luo, 2003; Ohno et al., 2004; Laird et al., 2005; Ohno et al., 2006; Mcconlogue et al., 2007; Ohno et al., 2007; May et al., 2011) oder Applikation von BACE Inhibitoren (Filser et al., 2015) verringern den zerebralen A β -Gehalt und beheben Defizite in Gedächtnisleistungen, elekt-

rophysiologischer Funktion und Synapsendichte im AD-Mausmodell. Daher zielen klinische Studien zur AD-Therapie auf direkte Inhibition von BACE ab, um den A β -Gehalt im AD-Hirn zu reduzieren. Allerdings haben diese Studien auf Grund der funktionalen Komplexität und des hohen Risikos der Nebeneffekte bei direkter BACE Inhibition, bis dato leider keine effektiven Therapieansätze für AD-Patienten hervorgebracht. Zudem ist der genaue Mechanismus, der den amyloidogenen Spaltungsprozess des Vorläuferproteins APP über β - und γ -Sekretase steuert und so A β -induzierte mikrogliale Neuroinflammation initiiert bisher ungeklärt. Bekannt ist hingegen die Lokalisation von BACE in sauren intrazellulären Kompartimenten wie den Endosomen (Kinoshita et al., 2003; Rajendran et al., 2008) und dem trans-Golgi Netzwerk (Kalvodova et al., 2005), da BACE sein pH-Optimum bei 4,5 hat (Vassar, 2002). Als Zymogen synthetisiert, werden die pre- und pro-Peptid Domänen im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem trans-Golgi Netzwerk entfernt (Bennett et al., 2000; Benjannet et al., 2001). Die Internalisierung von der Plasmamembran geschieht in Endosomen via retrogradem Transportweg von BACE zum Golgi-Apparat oder zu Lysosomen zur dortigen Degradation. Mitglieder der *Golgi-localized gamma-containing ADP ribosylation factor-binding* (GGA) Proteinfamilie interagieren über das Dileucin Bindemotiv mit BACE und regulieren seinen Transport gemäß seinem Phosphorylierungsstatus (He et al., 2005; Von Arnim et al., 2006; Tesco et al., 2007).

1.2.1.2 Post-translationale Modifikationen an BACE

Durch Anknüpfen von Zuckern, Fettsäuren, Ubiquitin, Phosphat-, Hydroxy-, oder Methylgruppen, wird nach der Synthese an Ribosomen, also post-translational, die Quartärstruktur von Proteinen verändert (Uy, Wold, 1977). Diese post-translationale Modifikationen (PTM) beeinflussen Stabilität, Lokalisation und Funktion der Proteine. Auch BACE wird post-translational modifiziert und in seiner Aktivität, intrazellulärem Transport und lysosomalen Degradation beeinflusst. Zum Beispiel beeinflusst die Phosphorylierung von BACE an der Aminosäuregruppe Serin 498 an seiner zytosolischen Domäne den retrograden Transport im Endosomen-Lysosomen-System (Pastorino et al., 2002; Wahle et al., 2005) und Phosphorylierung an der Aminosäuregruppe Threonin 252 durch

die Cyclin-abhängige Kinase 5 erhöht seine Aktivität (Song et al., 2015). Eine Ubiquitinierung an Lysin 501 dirigiert BACE zur Degradation zu Lysosomen (Kang et al., 2012) und BACE kann einer N-Glykosylierung an vier Asparaginresten (N153, N172, N223, N354) im ER und Golgi-Apparat unterzogen werden (Capell et al., 2000; Haniu et al., 2000). Die Modifikation durch die Glykosyltransferase MGAT3, welche den Zuckerrest bisecting N-acetylglucosamine (GlcNAc) an BACE glykosyliert, blockiert den Transport von BACE zu den Lysosomen und erhöht so dessen Enzymaktivität (Kizuka et al., 2015a). Diese aktuelle Studien von Kizuka und Kollegen (siehe Abb.3) zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen Glykosylierungsstatus, der Stabilität von BACE und dessen Effekt auf die A β -Synthese (Kizuka et al., 2015a; Kizuka et al., 2015b; Kizuka et al., 2016). Bisecting GlcNAc wird von dem Enzym MGAT3 an BACE glykosyliert und stabilisiert BACE in seiner Funktion als β -Sekretase. Nach Deletion von MGAT3, wird bisecting GlcNAc nicht mehr von BACE an dessen Oberfläche exprimiert, was zu einer Instabilisierung und Translokation von BACE zu den Lysosomen hin führt. Dort wird BACE degradiert und die Menge an A β sinkt aufgrund geringerer funktioneller Enzymkonzentration in den frühen Endosomen. Unbekannt ist, was MGAT3 bei AD dazu veranlasst den Zuckerrest bisecting GlcNAc an BACE zu glykosylieren.

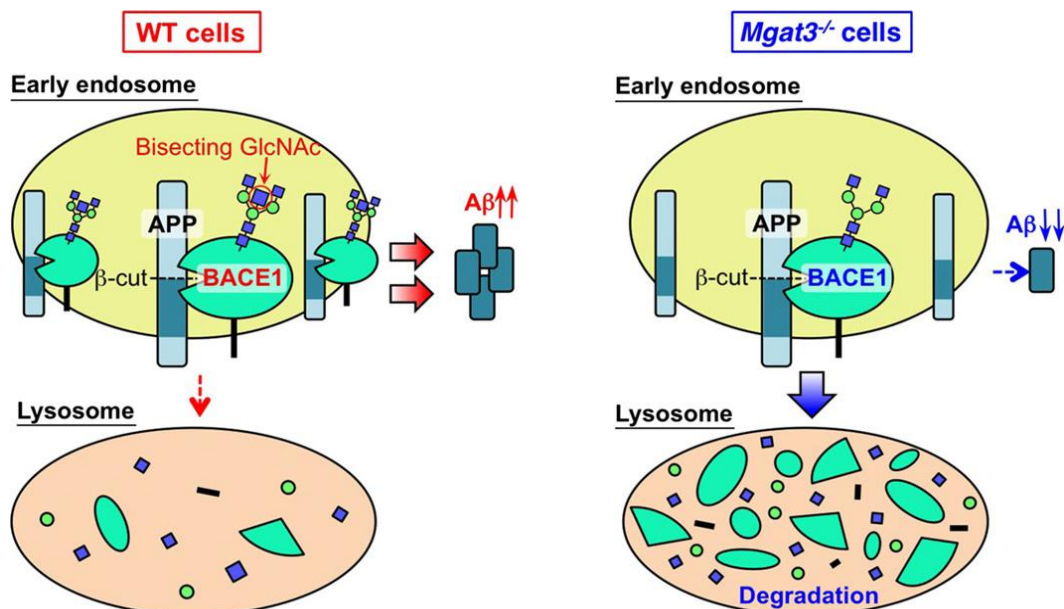


Abbildung 3: Stabilität von BACE nach Glykosylierung (entnommen aus (Kizuka et al., 2015a)). In Wildtyp (wt) Zellen ist BACE glykosyliert und als aktive β -Sekretase prozessiert es A β in frühen Endosomen. Nach Deletion von MGAT3 und ausbleibender Glykosylierung, wird BACE in den Lysosomen degradiert und der A β -Gehalt sinkt.

1.3 Tau

Neben A β gilt die hyperphosphorylierte Form des Mikrotubuli-assoziierte Proteins Tau als histopathologisches Charakteristikum der AD (Hernandez, Avila, 2007). Tau liegt unter physiologischen Bedingungen als lösliches, ungefaltetes Protein in Synapsen und da vor allem in Axonen vor. Es interagiert mit Tubulin, einem Protein des Zytoskellets und übernimmt eine Transport- und Stützfunktion (Weingarten et al., 1975; Drubin, Kirschner, 1986; Caceres, Kosik, 1990). Bei AD wird Tau beispielsweise an Serin 199-202 phosphoryliert und liegt in einer bis zu vierfach stärkeren phosphorylierten Form vor, als im gesunden Hirn (Kopke et al., 1993). In dieser hyperphosphorylierten Form tendiert Tau zur Aggregation zu den AD charakteristischen NFT (Grundke-Iqbal et al., 1986; Alonso et al., 1996; Sengupta et al., 1998; Alonso et al., 2001; Alonso Adel et al., 2004). Zu den, für die Hyperphosphorylation verantwortlichen, Kinasen zählen neben der Glykogen Synthase Kinase 3 β (Hanger et al., 1992), der Cyclin-abhängigen Proteinkinase 5 (Noble et al., 2003), der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Litersky, Johnson, 1992) auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38-MAPK) (Drewes et al., 1992; Li et al., 2003). Welche Mechanismen die Hyperphosphorylierung auslösen, versuchen Studien an Tau-transgenen (Tau^{tg}) Mäusen zu ergründen. Es wird vermutet, dass einige sich überschneidende Prozesse, wie Ansammlung von A β , verminderter zerebraler Glukosestoffwechsel und Inflammation, zu der krankhaften Akkumulation von pTau führen (Oddo et al., 2004; Kitazawa et al., 2005; Caccamo et al., 2006; Gong et al., 2006; Fonseca et al., 2009; Liu et al., 2009).

1.4 AD und Mikroglia vermittelte Neuroinflammation

Neuroinflammation ist ein Mechanismus, um Krankheitserreger oder geschädigte Zellen im Gehirn zu bekämpfen und zu entfernen. Erhöhte chronische Neuroinflammation ist ein gemeinsames Kriterium, dem einige neurodegenerative Erkrankungen einschließlich der AD zugrunde liegen. Diese Neuroinflammation wird durch Mikroglia initiiert und wirkt sich auf die AD-Pathogenese aus (zusammengefasst in (Wyss-Coray, Rogers, 2012)). In der frühen zerebralen Entwicklung wandern Mikroglia als Monozyten in das Hirn ein. Damit sind sie die hirnansässigen Immunzellen des ZNS und in allen Gehirnregionen an der Aufrechterhaltung der Homöostase und Gehirnentwicklung beteiligt. Aktivierung der

Mikroglia und erhöhte Expression inflammatorischer Mediatoren wurde bereits in postmortalem Hirngewebe von AD-Patienten nachgewiesen (Eikelenboom, Stam, 1982; Mcgeer et al., 1988). PET-Studien zeigen eine Korrelation zwischen Aktivierung der Mikroglia und der Krankheitsprogression in AD-Patienten (Cagnin et al., 2001b; Edison et al., 2008a). In dem Mausmodell der AD, in welchem das APP überexprimiert wird, können Aktivierung und Rekrutierung von Mikroglia um A β -Ablagerungen nachgewiesen werden, bevor neuronale Schädigung auftreten (Bolmont et al., 2008; Meyer-Luehmann et al., 2008). Kommt es durch beispielsweise A β -Plaques zu einer Aktivierung von mikroglialen Rezeptorkomplexen wie den *Toll-like* Rezeptoren (TLR) 2/4/6, schütten Mikroglia nach Aktivierung spezieller Kinasen proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interleukin (IL)-1 β aus und initiieren so die Neurotoxizität (Weninger, Yankner, 2001; Garden, La Spada, 2012). Mikroglia können allerdings auch neuroprotektiv wirken und A β phagozytisch abbauen (zusammengefasst in (Schafer, Stevens, 2015)).

1.5 Autophagie

Die Autophagie ist ein weiterer Mechanismus, um fehlgefaltete Proteinaggregate zu degradieren. Sie ermöglicht dadurch eine Energie-effiziente Proteinbiosynthese aus abgebauten Aminosäuren. Im Umkehrschluss bedeutet dies, fehlen dem Organismus Aminosäuren oder liegt ein niedriges Energieniveau vor, wird die Autophagie über Hemmung des *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) initiiert. Gleichzeitig aktiviert das Protein Beclin1 die Elongation der pre-autophagischen Strukturen (Abb.4 modifiziert nach (Moyzis et al., 2015)).

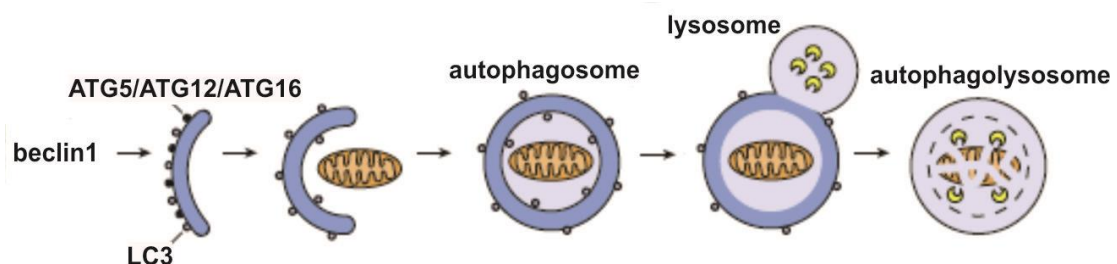


Abbildung 4: Ablauf des Autophagieprozesses (modifiziert nach (Moyzis et al., 2015)). Abgebildet sind die, an der Formierung des Autophagolysosoms beteiligten Proteine Beclin1, LC3B (LC3II), und der ATG5/ATG12/ATG16-Komplex.

Dem Signalweg mTOR nachgestellt, ist die Gruppe der ATGs, welche die Formation von Autophagosomen kontrollieren. Das pro *microtubule-associated pro-*

tein light chain 3 (LC3) wird durch ATG4 zu der zytosolischen Form LC3/ATG8 (LC3I) konvertiert und durch ATG7 aktiviert. Nun konjugiert ATG3 Phosphatidylethanolamine, ein Phospholipid und wichtiger Bestandteil von Biomembranen, an LC3I und konvertiert es so zu dem membrangebundenen LC3II und bewirkt zusammen mit dem ATG5/ATG12/ATG16-Komplex die Ausdehnung der isolierten Membran zu frühen Autophagosomen. Das Autophagosom fusioniert nun, unter Mitwirkung des Lysosomen assoziierten Membranproteins (LAMP) 2, einem lysosomalen Transmembranprotein, mit Lysosomen zu Autophagolysosomen. Nun dissoziiert LC3II und die abzubauenden Proteine werden mit Hilfe der aus dem Lysosom-entstammenden Enzyme degradiert, um neue Zellbaustoffe zu liefern (zusammengefasst in (Fader, Colombo, 2009; Nixon, 2013)). Im alternden Organismus können defekte Organelle und Proteine nicht mehr effizient recycelt werden. Eine gesenkte Autophagierate steht in Verdacht, die AD-Pathologie zu verstärken (Pickford et al., 2008; Yang et al., 2011). A β und hyperphosphoryliertes Tau können als Proteinaggregate nicht abgebaut werden und akkumulieren zu neurotoxischen Plaques bzw. NFT.

1.6 Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38

1.6.1 Klassifikation der p38-MAPK

Ein weiteres Enzym neben BACE, welches im AD-Hirn eine signifikant erhöhte Aktivität aufweist (Hensley et al., 1999a; Sun et al., 2003b) und dadurch eine modulatorische Rolle im AD-Verlauf einnehmen kann, ist die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38-MAPK). Um sich an verändernde extrazelluläre Umwelteinflüsse schnell anpassen zu können, erhalten Zellen über spezielle Rezeptoren der Zellmembran Signale und führen daraufhin spezifische PTM durch. Einer dieser überlebenswichtigen Mechanismen stellt die Phosphorylierung von Proteinen dar und wird durch die MAPKs vollzogen. MAPKs sind hoch konservierte Serin/Threonin Kinasen und werden in drei Hauptgruppen, die *extracellular signal-related kinases* (ERKs), die *c-jun N-terminal kinases* (JNKs) und die p38-MAPK eingeteilt (zusammengefasst in (Roux, Blenis, 2004)). Die p38-MAPK ist ein 38 kDa schweres Molekül und wird in α -, β -, γ (ERK6, SAPK3)- und δ (SAPK4)-p38 Isoformen unterteilt (Jiang et al., 1996; Li et al., 1996; Jiang et al., 1997). Die p38 Isoformen haben trotz 70 %iger Sequenzho-

mologie unterschiedliche Substrate und p38 α und β sind, im Gegensatz zu γ und δ , beide in ihrer enzymatischen Aktivität durch den Inhibitor SB203580 selektiv hemmbar (Tong et al., 1997; Badger et al., 1998). Neben den unterschiedlichen Substraten und Inhibitorspezifitäten, weisen die vier Isoformen auch unterschiedliche Expressionsprofile auf. p38 δ wird am stärksten in endokrinen Drüsen exprimiert (Goedert et al., 1997), γ im Skelettmuskel (Li et al., 1996), β im Herz und Hirn und α weist, neben einer Expression im Herzen, eine starke zerebrale Expression in Synapsen und Mikrogliazellen im Hippocampus und im Cortex auf (Jiang et al., 1996; Lee et al., 2000a). p38 β , aber vor allem das in den Immunzellen exprimierte p38 α spielen daher bei der Vermittlung inflammatorischer Stimuli und Antworten des angeborenen Immunsystems eine entscheidende Rolle.

1.6.2 Aktivierung der p38-MAPK

Generell wird die ERK Kaskade durch Hormone und Wachstumsfaktoren initiiert (Boulton et al., 1991). Die JNKs sowie p38-MAPK werden unabhängig von den ERKs über Wachstumsfaktoren (Foltz et al., 1997), extrazellulären Stress wie ultraviolettes Licht (Pandey et al., 1996), Hitze oder osmotischen Schock (Han et al., 1994), Pathogene wie das in bakteriellen Zellmembranen exprimierte Lipopolisaccharid (Malcolm, Worthen, 2003) und inflammatorische Zytokine (Freshney et al., 1994; Lee et al., 1994) aktiviert. Die Inhibierung der p38-MAPK Aktivität hingegen erfolgt über Dephosphorylierung durch MAPK Phosphatasen (Chu et al., 1996; Camps et al., 1998; Takekawa et al., 1998; Takekawa et al., 2000). Über genannte Stimuli und deren spezifische Rezeptoren wie den TLRs, werden GTPasen aktiviert. Diese Guanosin-5'-triphosphat (GTP)-bindende Proteine fungieren als Vermittler zwischen den G-Protein (Guaninnucleotid-bindenden Protein)-gekoppelten Rezeptoren und den Effektoren, den MAPK Kinasen Kinasen (MAP3K) dieses Signalwegs. Die GTP-bindenden Proteine der Rho Familie wie *cell division control protein 42* (Cdc42) und *ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) (Bagrodia et al., 1995; Zhang et al., 1995) aktivieren also die MAP3K wie z.B. die *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), welche wiederum die MAPK Kinasen (MAP2K) MKK3 MKK4 oder MKK6 phosphorylieren (siehe Abb.5, entnommen aus (Cuadrado, Nebreda,

2010)). Apoptose gilt als programmierter Zelltod und ist ein streng regulierter physiologischer Prozess, der während der Entwicklung von großer Bedeutung für den Erhalt des Gleichgewichts zwischen Zellteilung und Zelltod ist.

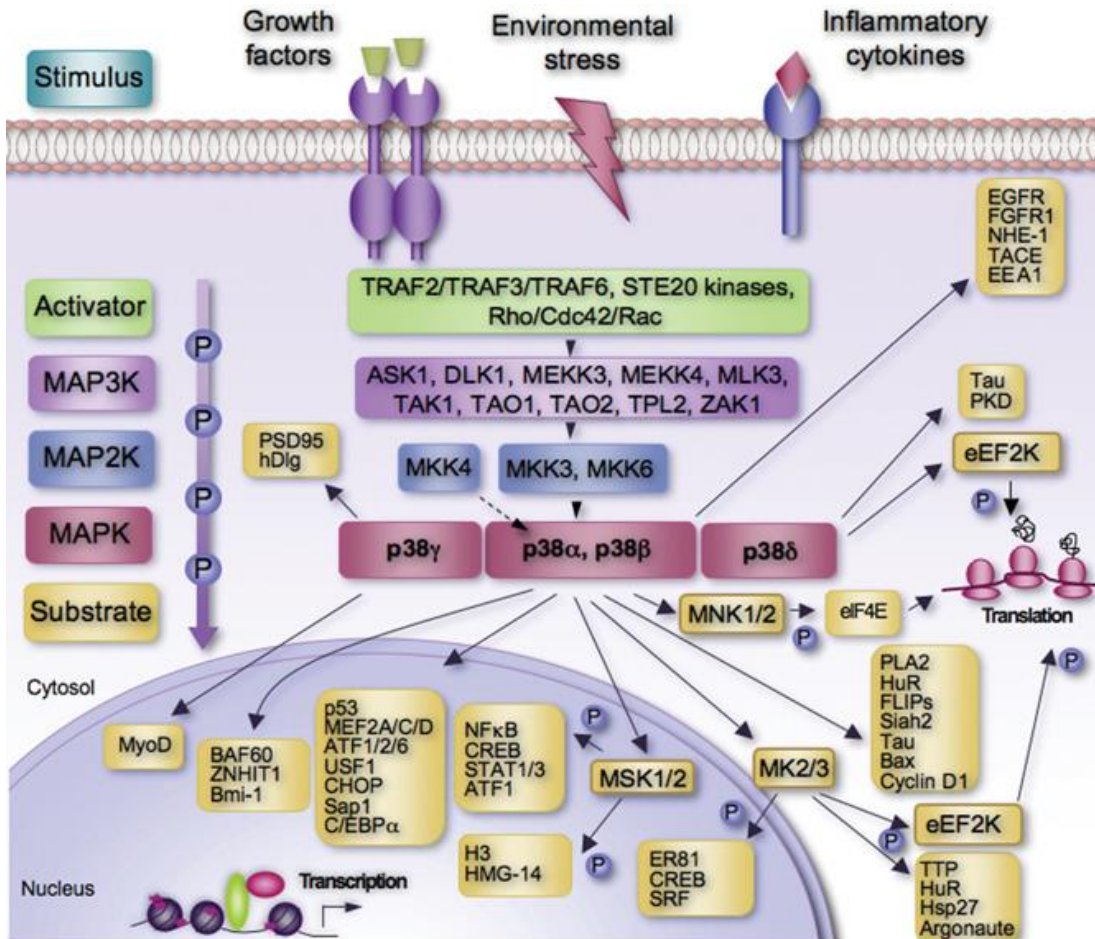


Abbildung 5: p38-MAPK Signalweg. Extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Umgebungsstress und inflammatorische Zytokine können p38-MAPKs aktivieren. Abgebildet sind hier im Zytosol typische Aktivatoren (grün unterlegt) die über Phosphorylierung die MAP3Ks (lila unterlegt) und diese wiederum die die MAP2Ks (blau unterlegt) bis hin zu den MAPKs (rot unterlegt) aktivieren. Nun kann p38-MAPK Substrate im Zytosol oder Transkriptionsfaktoren im Zellkern (gelb unterlegt) aktivieren (entnommen aus (Cuadrado, Nebreda, 2010)).

In AD kommt es durch Absterben von Neuronen zu Neurodegeneration, welche durch Apoptose eingeleitet wird (Su et al., 1994; Stadelmann et al., 1999). Apoptose wird durch Caspasen, Enzyme, die zur Defragmentierung von Proteinen und DNA führen, reguliert und p38-MAPK ist wiederum in dem Signalweg von Caspasen und Apoptose zwischengeschaltet (Huang et al., 1997).

1.6.3 Rolle der aktivierten p38-MAPK in AD

Neben chronischen Krankheiten mit mikroglialer Aktivität wie Rheumatische Arthritis (Schett et al., 2000) und entzündliche Darmerkrankungen (Hollenbach et al., 2004) ist auch bei neurodegenerativen Krankheiten wie Amyotrophe Lateralsklerose (Raoul et al., 2002), Parkinson (Wilms et al., 2003) und Multipler Sklerose (Lee et al., 2000b; D'aversa et al., 2002) eine gesteigerte p38-MAPK Aktivität nachgewiesen. Die Aktivierung der p38-MAPK Signalkaskade trägt auch bei AD zum Krankheitsverlauf bei (zusammengefasst in Abb.6, modifiziert nach (Kim, Choi, 2010)). Bei der Amyloid-Hypothese, mit A β als Initiator und hyperphosphoryliertem Tau als Endprodukt mit nachfolgender Apoptose gilt p38-MAPK als Verbindung zwischen den beiden toxischen Aggregaten. Dabei interagiert A β mit APP und führt so zu einer Komplexbildung oder APP Dimerisation (Hashimoto et al., 2003; Lu et al., 2003). Dadurch wird der apoptotische Signalweg über ASK1 (Galvan et al., 2007) und MKK6 (Peel et al., 2004) aktiviert. Aktive p38-MAPK ist wiederum bekannt für Tau-Phosphorylierung in Neuronen (Reynolds et al., 1997; Zhu et al., 2000; Li et al., 2003) und induziert so Apoptose (Lu et al., 2003) (Abb.6 B). p38-MAPK ist auch bekannt dafür, die Modulation der A β -initiierten mikroglialen Inflammation (Munoz et al., 2007; Bachstetter et al., 2011) und A β -induzierten synaptischen Schädigung in kultivierten hippocampalen Schnitten (Li et al., 2011b) zu übernehmen (Abb.6 C). Nach Inhibition von p38-MAPK konnten diese Effekte *in vitro* (Xie et al., 2004) und *vivo* aufgehoben werden (Bhaskar et al., 2010; Li et al., 2011a). Ferner wurden extrazelluläre A β -Plaques zusammen mit einem gesteigerten Level an p38-MAPK in postmortalen AD-Hirnen nachgewiesen (Hensley et al., 1999b; Pei et al., 2001; Sun, 2003). Eine gesteigerte p38-MAPK Aktivität konnte bereits nach Injektion von aggregiertem A β in Ratten (Giovannini et al., 2002) als auch in transgenen AD-Mausmodellen (*Swedish mutation*) (Savage et al., 2002) beobachtet werden, was A β als pathogenen p38-MAPK Aktivator herausstellt. Darüber hinaus ist p38-MAPK an der transkriptionellen und enzymatischen Aktivierung von γ - und β -Sekretase beteiligt (Tamagno et al., 2005; Shen et al., 2008). Oxidantien gelten als Aktivatoren der MAPK und Tamagno und Kollegen konnten zeigen, dass lediglich der JNK/ p38-MAPK Signalweg an der Überex-

pression und –aktivierung von BACE beteiligt ist (Abb.6 D) und ERK1/2 die Transkription von BACE sogar hemmt (Tamagno et al., 2009).

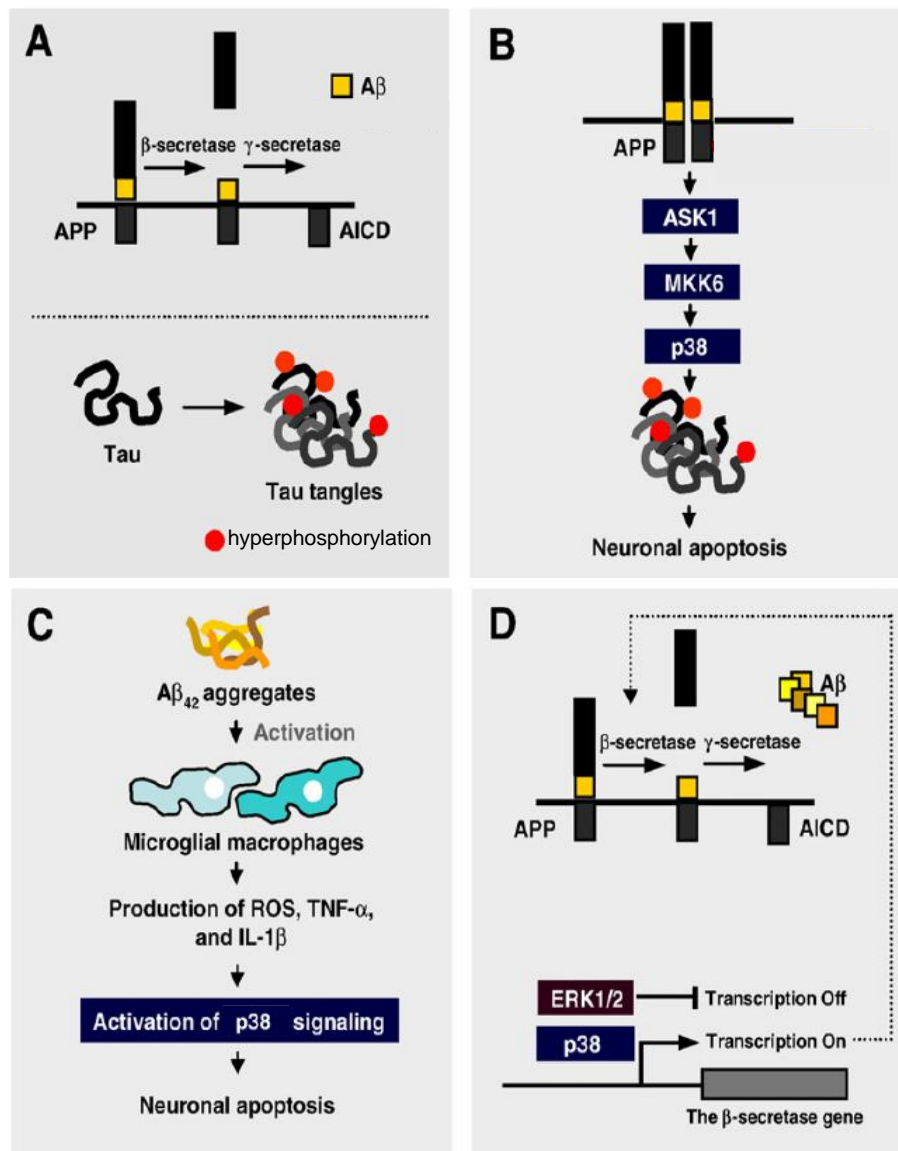


Abbildung 6: Multiple Beteiligung von p38-MAPK an der AD-Pathogenese (modifiziert nach (Kim, Choi, 2010)). A: Aggregation von Aβ und pTau. B: Aβ-induzierte APP Dimerisation führt über p38-MAPK zu pTau und leitet Apoptose ein. C: Aβ-Aggregate aktivieren Mikroglia welche pro-inflammatorische Zytokine sezernieren, p38 -MAPK aktivieren und Apoptose einleiten. D: Aktivierte p38-MAPK erhöht die Transkription des β-Sekretasen Gens. Im Gegensatz inhibiert ERK1/2 die Gentranskription der β-Sekretase.

Damit rückt p38-MAPK als möglicher Sekretasen-Modulator in den Fokus der AD-Forschung. Diese Studien verdeutlichen die vielseitigen Mechanismen, durch welche p38-MAPK in der AD-Pathogenese involviert ist. Allerdings, konnte bisher nicht zwischen Effekten der α und β-Isoformen in Neuronen bzw. Mikrogliazellen oder Gliazellen unterschieden werden, obgleich beide Isoformen

und Zelltypen unterschiedliche Funktionen einnehmen. Darüber hinaus ist bekannt, dass p38-MAPK und insbesondere die α -Untereinheit (Hale et al., 1999) die A β -induzierte mikrogliale Neuroinflammation vermittelt und *cluster of differentiation* (CD) 14 sowie die TLRs 2 und 4 für die Aktivierung der Mikroglia über fibrilläres A β zuständig sind (Reed-Geaghan et al., 2009). Speziell die pharmakologische p38 α Inhibition führt in AD-Mausmodellen zu einer verminderten Inflammation und Zytokinexpression, sowie zu verbesserten kognitiven Leistungen (Munoz et al., 2007). Trotz dieser Vielzahl von Hinweisen auf eine Beteiligung von p38 α -MAPK an der AD-Pathogenese, bleiben genauere molekulare Zusammenhänge oder Schlüsselmechanismen bisher unerforscht. Dies macht eine gezielte und damit effektive Medikation unmöglich. Bis dato existiert keine Forschungsarbeit, die in *vivo* den direkten Effekt von p38 α -MAPK auf die A β -Synthese und insbesondere die β -Sekretasen-Aktivität untersucht.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte einer p38 α -MAPK-Defizienz in Neuronen jeweils auf kognitive Funktion, A β -Pathologie, synaptische Plastizität sowie Neurodegeneration und Neuroinflammation in APP/PS1^{tg} Mäusen zu untersuchen. Um den kompletten Phänotyp der AD zu repräsentieren, sollen zusätzlich die Effekte nach neuronaler p38 α -MAPK-Defizienz auf kognitive Funktion, Tau Phosphorylierung und synaptische Plastizität in Tau^{tg} Mäusen evaluiert werden. Im Fokus dieser Forschung steht die mögliche regulatorische Rolle der p38 α -MAPK auf die A β -Synthese und den Effekt auf die AD-Pathologie. Dazu soll ermittelt werden, ob:

- 1.) eine neuronale p38 α -MAPK Defizienz die A β -Pathologie, die damit verbundenen kognitiven Defizite, synaptische Plastizität und neuronale Degradation beeinflusst.
- 2.) p38 α -MAPK die BACE Produktion oder Degradation einleitet und welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Arbeiten, soll spezifisch die regulatorische Rolle des neuronalen p38-MAPK α Isoforms nach Deletion im AD-Mausmodell entschlüsselt werden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Arbeitsmaterialien

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Firma
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Accu Jet Pipettes Control	BrandTech Scientific, Essex, USA
Autoklav systec 3870 ELV	Tuttnauer, Breda, NLD
Axiovert 25 Inversmikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, DE
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss Mikroskopie
Brutschrank (Typ A)	Melag, Berlin, DE
Bühler Inkubationshaube TH-30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Container für Flüssigstickstoff	KGW-Isotherm, Karlsruhe, DE
Cryomikrotom	Leica, Nussloch, DE
Digital Camera DXM1200	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Eismaschine	Ziegeira, Isernhagen DE
Einbettmaschine MICROMSTP120	Thermo Fisher Scientific, Bonn, DE
Elektronische Analysewaage (770)	Kern, Balingen-Frommern, DE
Epson Perfection V700 Fotoscanner	Epson, Meerbusch, DE
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, DE
FACS Canto II Durchflusszytometer	BD, Biosciences, Heidelberg, DE
Gefrierschrank UF75-110 T	Colora, Frankfurt, DE
HERAcell CO ₂ Inkubator	Heraeus, Hanau, DE
HERAfreeze-85°C freezer	Heraeus
Homogenisator Sonopuls HD 2070	BANDELIN electronic, Berlin, DE
InoLab pH 720 pH-Meter	WTW, Weilheim, DE
Jouan B4a Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific
Konfokales Mikroskop (LSM 510 Meta)	Carl Zeiss Mikroskopie
Kühlbank (Cold Plate, B3120060)	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Kühlschrank KG39VV130	Siemens, München, DE
Magnethalter Dynabeads® MPC®-S	Invitrogen, Darmstadt, DE
Microtome Blades A35	Feather, Osaka, Japan
Mini Trans-Blot® cell	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Mikroskop (Eclipse E600)	Nikon GmbH
Mikrotom (SM 2000 R)	Leica
Mikrowelle R-204	Sharp Electronics , Hamburg, DE
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE
Orbitalschüttler Rocky 3D	Labortechnik Frübel, Lindau, DE
OPTIMAX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld, DE
PowerPac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories
Präzisionswaage 770	Kern & Sohn, Balingen, DE

Präzisionswaage CP 42023	Sartorius, Göttingen, DE
PS250 Power Supply	Hybaid, Heidelberg, DE
PTC 200 DANN Engine Thermal Cycler	MJ Research, St. Bruno, CAN
Sterilbank Biowizard KR-200 Bench	Kojair, Tech Oy, Vilppula, FIN
Sunrise Mikrotiterplattenleser	Tecan, Männedorf, CHE
Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader	Bio Tek, Winooski, VT
Thermoblock TBD-120	Biosan, Riga, LVA
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischkühlzentrifuge 4K15C	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, DE
TLA-55 Rotor (festschwingend)	Beckman Coulter
Trockenschrank	Heraeus
Überkopffrotor RS RR5	Phoenix Instruments, Garbesen
Überkopffrotor STR4	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Ultrasonic bath, Transsonic T780	Elma, Singen, DE
Vortex Shaker REAX 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad GFL1083 (Klonierung)	GFL, Burgwald, DE
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, DE
Wasserbassin (water maze)	Noldus
XCell SureLock™ Mini-Cell System	Invitrogen

Tabelle 2: Hilfsmittel

Bezeichnung	Firma
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire;UK
Beckman-Coulter Reaktionsgefäß	Beckman
Biosphere Filterspitze 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Chamber slides (8-Well)	BD
Cryotubes 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Deckgläser (24x32mm, Dicke 0,13-0,16)	R.Langenbrinck, Emmendingen, DE
ECL-Plus Reagenz	PerkinElmer, Waltham, USA
EDTA Röhrchen	Eppendorf
Einwegimpföse	Sarstedt
Farbekasten mit Falzdeckel und Rahmen 2480/2481	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, DE
Filterpapier GB003	Whatman, Dassel, DE
Glaswaren	VWR
Gradientengel auf Tris-tricin Basis	Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, DE
Imaging Software, NIS Elements, Basic Research 3.00	Nikon GmbH
Kanülen	VWR
Messzylinder, 1000ml	VitLab GmbH, Großostheim, DE
Mikroplattenlesegerät, Sunrise	TECAN, Männedorf, CHE
Mikrotestplatten	Sarstedt
Mini-Protean 3 Short Plates	Bio-Rad Laboratories

Mini-Protean 3 Spacer Plates, 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories
Mini-Protean Gelkamm 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories
Nunc MaxiSorp 96-Wellplatte (Schwarz)	Thermo Fisher Scientific
Objektträger (76x26mm/3x1inch)	R.Langenbrinck
Objektträgerkasten nach Hellendahl 2460	Assistent
Optical 96-Well-Fast Thermal Cycling Plates	Applied Biosystem
Parafilm M all-purpose laboratory film	PechineyPlasticPackaging, Chicago, USA
PCR Soft Tubes, 0,2ml	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Pipette (Research 0,5-10µl)	Eppendorf
Pipette (Research 100-1000µl)	Eppendorf
Pipette (Research 10-100µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt
Pipettierhelfer (accu-jet)	BrandTech Scientific, Essex, USA
Plastikküvette	Kartell, Noviglio, ITA
Polystyrol-flaschen, -schalen, -platten (+)	Sarstedt
Protran Nitrozellulose Transfermembran	Whatman
Präparierbesteck, rostfrei, Art. Nr. 12017	Bochem Instrumente, Weilburg, DE
Protein G Dynabeads	Life Technologies
Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf,
PVDF Membran	Roche,
Reagenztuben 15 und 50ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	VWR
Schnelleindeckmittel (Entellan®Neu)	Merck, Darmstadt, DE
Schwenkbank, Rocky 3d	Labortechnik Fröbel GmbH
Selbstklebende optische Folie, MicroAmp	Applied Biosystem
Serologische Pipetten 5ml, 10ml 25ml	Sarstedt
Software PCR, SDS v.1.3.1	Applied Biosystem
Spritzen	B. Braun, Melsungen, DE
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CHE

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Aceton	Hedinger, Stuttgart, DE
Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, DE
(3-Aminopropyl)triethoxysilan A3648	Sigma-Aldrich Chemie
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie
Antifade mounting medium (+DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Antistreptomycin	Thermo Fisher Scientific
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie
B27	Thermo Fisher Scientific
Bafilomycin	Sigma-Aldrich Chemie
Bio-Rad Protein Assay Färbekonzentrat	Bio-Rad Laboratories

Blasticidin	Life Technologies
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie
Carestream® Kodak® GBx Entwickler und Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie
Casein	Fluka, Buchs, CHE
Chloroform	Merck
C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P	Sigma-Aldrich Chemie
Chymostatin	Sigma-Aldrich Chemie
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie
Diaminobenzidinetetrahydrochloride hydrate, 97 % (D5637-5G)	Sigma-Aldrich Chemie
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie
dNTP Mix	Roche
DMEM	Invitrogen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie
Dynabeads® CD4 Magnetkugeln	Life Technologies
DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit	FINNZYMES, Espoo, Finnland
Entellan Eindeckmedium	VWR, Darmstadt, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie
Ethylendiamintetraacetat acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie
Ethylenglycol tetraacetic acid (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie
Fötale Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach, Germany
G418	Sigma-Aldrich Chemie
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich Chemie
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie
Hank's buffered salt solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific
HCl (Salzsäure)	Sigma-Aldrich Chemie
Hexamer Random Primer	Invitrogen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, DE
Isopropanol	Carl Roth
KCl	Merck
LB-Agarpulver und Broth	Sigma-Aldrich Chemie
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie
Magermilchpulver	Carl Roth
Mayers Hämaunlösung	Merck
MES	Sigma-Aldrich Chemie
Methanol (AnalaR NORMAPUR)	VWR
3-Methyladenin (3MA)	Calbiochem, Darmstadt, DE
2-Methylbutan	Otto Fischar, Saarbrücken, DE
MgSO ₄	Sigma-Aldrich Chemie
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega Corporation, Madison, USA

NaCl	Merck
NaF	Sigma-Aldrich Chemie
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O	Merck
Na ₃ PO ₄	Carl Roth
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich Chemie
Neurobasalmedium	Life Technologies
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie
Nuklease freies Wasser	Life Technologies
Nukleotidenmix (je 10mM)	Roche
Opti-Mem Medium	Invitrogen
Okadasäure	Sigma-Aldrich Chemie
Pageruler Prestained Protein Ladder	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie
Percoll	GE Healthcare
PMSF	Thermo Fisher Scientific
2-Propanol (=Isopropylalkohol)	Carl Roth
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche
Rapamycin	Sigma-Aldrich Chemie
Random Primers Hexamers	Invitrogen
Rinderalbumin	Sigma-Aldrich Chemie
RQ1 RNase-Free DNase (Cat.# M6101)	Promega
SB203580	Calbiochem
SDS	Carl Roth
Spectinomycin	Sigma-Aldrich Chemie
Substrat für β- und γ-Sekretase	Calbiochem
Sucrose	VWR
SuperScript [®] III Reverse Transcriptase	Invitrogen
TaqMan [®] Gene Expression (TNFα, NOS2, IL1β, CCL2, IGF1, BDNF, Arc, GPDH)	Applied Biosystem
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, DE
Tris	Carl Roth
Trisma [®] Base	Sigma-Aldrich Chemie
Triton X-100	Carl Roth
Tissue-Tec [®] O.C.T compound	Sakura Finetek GmbH, Staufen, DE
Trizol [®] Reagent	Invitrogen
Trypsin	Invitrogen
Tween [®] 20	Carl Roth
Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %	Otto Fischar
Xylol	Hedinger, Stuttgart, DE
Zitronensäure Monohydrat	Serva

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
<u>Blockingpuffer IHC:</u>	0,2 % Casein, 0,1 % Tween-20, 0,1 % Triton-X, in 1x PBS
<u>β-Sekretase-Puffer :</u>	100 mM Natriumacetat [pH 4,5]
<u>10x Zitratpuffer:</u>	2,1 g /L Zitronensäure Monohydrat [pH 6,0]
<u>DAB Lösung:</u>	1 mg/ml DAB in 1x PBS + 1 µl H ₂ O ₂ /3 ml Lösung [pH 6,6]
<u>FACS-Puffer:</u>	HBSS+ 4 % FCS (eng. <i>fetal calf serum</i>)
<u>γ-Sekretase-Puffer:</u>	50 mM Tris/HCL [pH 6,8] und 2 mM EDTA
<u>Guanidinpuffer:</u>	5 M Guanidin-HCL, 50 mM Tris [pH 8,0]
<u>HB Puffer:</u>	0.25 M Sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM EDTA [pH 7,4]
<u>High-Salt Puffer :</u>	0,1 M MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgSO ₄ , 0,75 M NaCl, 0,02 M NaF, 1 mM PMSF, 1x Proteaseinhibitorcocktail
<u>H₂O₂-Methanol-Lösung:</u>	36,5 ml dH ₂ O, 8,5 ml Methanol, 5 ml H ₂ O ₂ (30 %)
<u>Ladepuffer:</u>	187,5 mM Tris/HCl [pH 6,8], 6 % SDS, 30 % Glycerin, 15 % β-Mercaptoethanol, 0,03 % Bromphenolblau
<u>Lysispuffer A:</u>	50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 5 mg/ml Pepstatin A, 5 mg/ml Chymostatin, 5 mg/ml Leupeptin, 5 mg/ml Aprotinin, 50 nM Okadasäure, 5 mM Na ₃ PO ₄ , 2 mM Na ₃ VO ₄ , 1 mM DTT, 50 mM NaF, 2x Proteaseinhibitorcocktail
<u>10x PBS:</u>	400 g NaCl, 10 g KCl, 71 g Na ₂ HPO ₄ , 69 g NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O, auf 5 L dH ₂ O [pH 7,4]
<u>PBS/T:</u>	1 L 1x PBS + 500 µl Tween20
<u>Puffer I</u>	PBS + 0.1 % FCS + 2 mM EDTA (steril filtriert)
<u>Puffer II</u>	DMEM + 2 % FCS (steril filtriert)
<u>RAB-Puffer</u>	0,1 M MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgSO ₄ , 0,75 M NaCl, 0,02 M NaF, 1 mM PMSF
<u>RIPA Puffer:</u>	50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % Desoxycholsäure, 1 % NP-40, und 5 mM EDTA, 1x Proteaseinhibitorcocktail
<u>RIPA Puffer für Tau:</u>	150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxy-Na, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-Cl [pH 7,5], 25 mM NaF, 100 mM Na ₃ VO ₄ , 5 mM EDTA, 40 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P, 1x Proteaseinhibitorcocktail
<u>10x SDS Puffer:</u>	Tris 250 mM, Glycin 1,92 M, SDS 1 % (w/v)
<u>Sucrosepuffer</u>	10 mM Tris/HCl [pH 7,4], 1 mM EDTA, 200 mM Sucrose
<u>10x TBS:</u>	302,5 g Trisbase, 425 g NaCl, auf 5 L dH ₂ O [pH 7,4]
<u>TBS/T:</u>	1 L 1x TBS +500 µl Tween20
<u>10x Transferpuffer:</u>	248 mM Tris, 1,84 M Glycin; <u>1x Transferpuffer:</u> 100 ml 10x Transferpuffer mit 200 ml Methanol auf 1 L dH ₂ O
<u>Verdünnungslösung IHC</u>	Blockingpuffer IHC: 1:10 verdünnt in 1x PBS

Tabelle 5: Kits

Bezeichnung	Firma
BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector kit	Life Technologies
DETACHaBEAD®CD4	Life Technologies
DyNAmo™ Flash probe qPCR kit	Thermo Scientific
DyNAmo™ Flash SYBR Green qPCR kit	Thermo Scientific
GeneArt® CRISPR Nucleas Vector kit	Life Technologies
In situ cell death detection kits, Ap	Roche
pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR	Life Technologies
PureLink® Quick Plasmid Miniprep kit	Life Technologies
PureLink® HiPure Plasmid Filter DNA Purification kit	Life Technologies
RNEasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Western Lightning Plus ECL kit	Perkin Elmer Inc., Waltham USA

Tabelle 6: Für Western blot verwendete Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Klon	Verdünnung	Herkunft
ATG5	Kaninchen	D5F5U	1:1000	CST
α-Tubulin	Maus	DM1A	1:10000	abcam, Cambridge, UK
Amyloid β	Maus	W0-2	1:1000	Millipore, Schwallbach, DE
β-Actin	Kaninchen	polyklonal	1:3000	CST
BACE	Maus	137612	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, USA
BACE	Kaninchen	D10E5	1:1000	CST
Beclin1	Kaninchen	D40C5	1:1000	CST
Calnexin	Kaninchen	polyklonal	1:1000	abcam
CREB	Kaninchen	48H2	1:1000	CST
GGA1	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Novus Biologicals, Littelton, USA
GM2A	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Thermo Fisher Scientific
GSLII	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Vector Laboratories
LAMP1	Kaninchen	C54H11	1:1000	CST
LC3B	Kaninchen	D11	1:1000	CST
MGAT3	Kaninchen	polyklonal	1:800	abcam
Munc18-1	Kaninchen	polyklonal	1:1000	CST
p38	Kaninchen	polyklonal	1:1000	CST
pCREB	Kaninchen	9198	1:1000	CST
p-p38	Kaninchen	polyklonal	1:1000	CST
pSerin	Maus	PSR45	1:62,5	Sigma-Aldrich
pTAU	Maus	AT8	1:1000	Thermo Fisher Scientific
pThreonin	Kaninchen	polyklonal	1:50	CST
PSD95	Kaninchen	polyklonal	1:1000	CST
SNAP25	Kaninchen	polyklonal	1:1000	CST
Synaptophysin	Maus	SY38	1:1000	abcam
Tau	Maus	HT7	1:1000	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 7: Für Western blot verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
anti Maus-HRP	Ziege	1:3000	Dako, Hamburg, DE
anti Kaninchen-HRP	Ziege	1:3000	Promega
anti Maus IgG <i>light chain</i> -HRP	Ziege	1:3000	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
anti Kaninchen IgG <i>light chain</i> -HRP	Maus	1:3000	Jackson ImmunoResearch
Avidin -HRP	Kaninchen	1:2000	Vector Laboratories

Tabelle 8: Für Immunzyto- und Immunhistochemie (IHC) verwendete Primärantikörper

Antigen	Ursprung	Klon	Verdünnung	Herkunft
Amyloid β	Maus	6F/3D	1:200	Dako
BACE	Maus	137612	1:200	R&D
Cathepsin D	Kaninchen	epr3057y	1:200	abcam
CD4-PerCP	Maus	L200	20 μ l/ 1Mio Zellen	BD
Iba1	Kaninchen	polyklon	1:500	Wako, Neuss, DE
IgG1 κ Isotypkontrolle	Maus	mopc-21	20 μ l/ 1Mio Zellen	BD
LC3A/B	Kaninchen	D3U4C	1:200	CST
NeuN	Maus	A60	1:200	Millipore
P38	Kaninchen	polyklon	1:200	CST

Tabelle 9: Für Immunzytochemie und IHC verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Ursprung	Fluorophor	Verdünnung	Herkunft
Maus	Ziege	Cyanin (Cy) 3	1:200	Jackson ImmunoResearch
Kaninchen	Ziege	Alexa 488	1:200	Life Technologies

Tabelle 10: Primerpaare für die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR[®] Green

Gen	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
Maus <i>bace</i>	TTGTAGGGCTAGGGATGGTC	CCTAACCTGCTGGATGAAT
Maus <i>ps1</i>	CAATGGTGTGGTTGGTGAAT	GTTCCAGAACCACTGTCCT
Maus <i>nicastatin</i>	ACCAGGTGGAGGATCTTCTG	AGGACAACCTCAGGGACACC
Maus <i>gapdh</i>	ACAACCTTGGCATTGTGGAA	GATGCAGGGATGATGTTCTG
Humanes <i>bace1</i>	TTGAAGCTGCAGTCAAATCC	CCAGAAACCATCAGGGAACCT
Humanes <i>ps1</i>	CCGAAAGGTCCACTTCGTAT	CCACACCATTGTTGAGGAGT
Humanes <i>nicastatin</i>	GGGTTCCCTGATTAAAGCCAA	CGTCACCCAAGTAGGACCTT
Humanes <i>gapdh</i>	GAAGGACTCATGACCACAGT	GTCATCATATTTGGCAGGTT

2.1.2 Bereitgestellte Zelllinien

Die APP^{tg} SHSY5Y Zelllinie, mit Überexpression des humanes APP695 und A β (Konstrukt pEYFP-N1-hAPP695) wurde von Dr. Kan Xie (Neurologie, Universität des Saarlandes, Homburg, DE) gefertigt und bereitgestellt. Die LC3-

green fluorescent protein (GFP)- red fluorescent protein (RFP)-transgene SHSY5Y Reporterzelllinie für Autophagie wurde durch von Yiren Qin (Neurologie, Universität des Saarlandes, Homburg, DE) mit dem Expressionsvektor, gestellt von T. Yoshimori (Addgene plasmid # 21074), gefertigt und bereitgestellt

2.1.3 Transfektionsvektoren

Die verwendeten Transfektionsvektoren sind in folgender Abb.7 dargestellt.

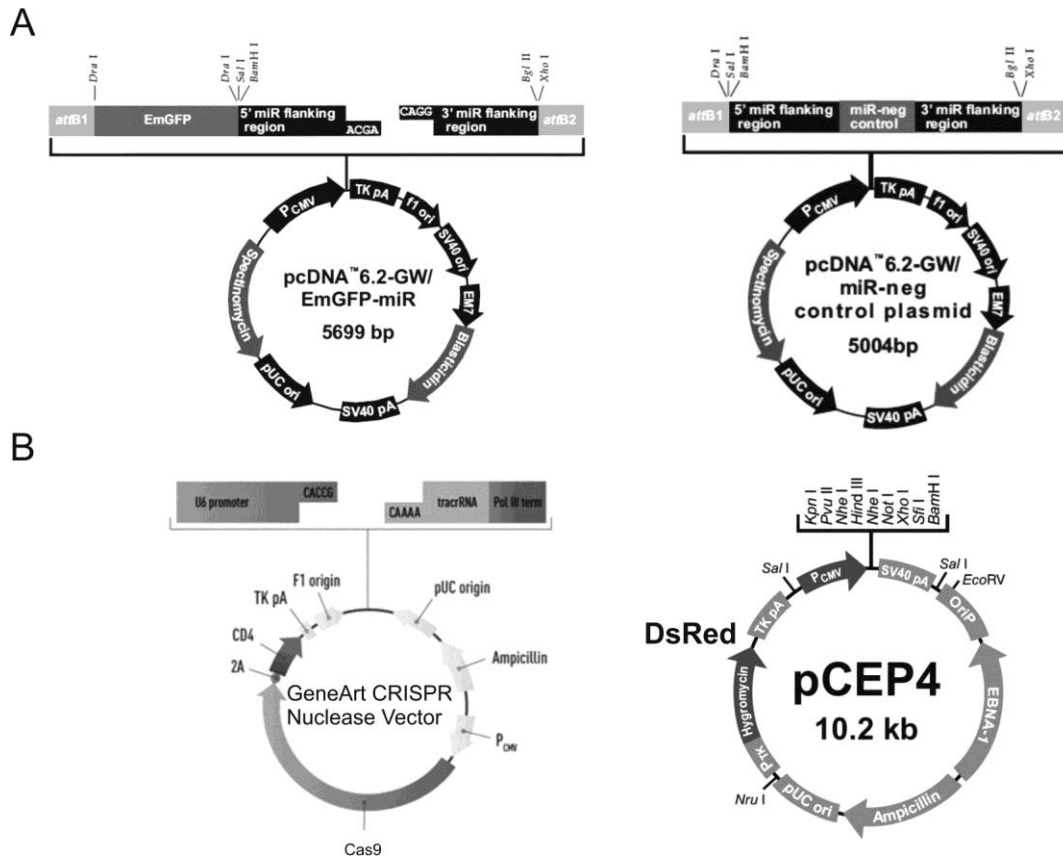


Abbildung 7: Transfektionsvektoren (modifiziert und entnommen den jeweiligen Produktdatenblättern). pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR wurde zur stabilen Transfektion der p38α-MAPK knock down (kd) Zelllinie verwendet. pcDNA™6.2-GW/-miR-neg diente dabei als Negativkontrolle für den kd (A: Vektorkarte entnommen von Seite 60-61 aus (Invitrogen, 2010a)). Der GeneArt CRISPR Nuclease Vector (Vektorkarte entnommen von Seite 13 aus (Lifetechnologies, 2014) wurde, zusammen mit dem Plasmid pCEP4 (Vektorkarte entnommen von Seite 8 aus (Invitrogen, 2010b) mit modifizierter Expression von DsRed (des aus der Seeanemone *Discofoma sp.* entstammende roten Fluoreszenzproteins), zur stabilen Transfektion der MGAT3 kd- und Kontroll-Zelllinien verwendet (B).

2.1.4 Bakterien, Kulturmedien und Selektionsantibiotika

Die Bakterien *one shot competent E.coli* (Invitrogen) wurden nach Herstellerangaben zur Amplifikation der Transfektionsvektoren, eingesetzt. Die Bakterien wurden auf *lysogeny broth* (LB)-Agarplatten bzw. in LB-Medium gezüchtet. Um 20 ml LB-Agarplatten herzustellen, wurden 35 g LB-Agarpulver in 1 L dH₂O ge-

löst und bei 121 °C sterilisiert. Die Suspension wurde auf 60 °C abgekühlt, 100 mg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotika hinzugefügt und anschließend in 10 cm Schalen gegossen. Als Flüssignährmedium wurden 20 g LB-Broth-Pulver in 1 L dH₂O gelöst und bei 121 °C sterilisiert. Das Selektionsantibiotikum wurde nach Abkühlen der Flüssigkeit auf 60 °C hinzugefügt.

2.1.5 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) Oligonukleotide sind in Tab. 11 aufgelistet und wurden von Invitrogen bezogen.

Tabelle 11: Sequenzen der transfizierten Oligonukleotiden

Name	Sequenz 5'-3'
p38α-MAPK top-509	TGCTGATATGATGGACTGAAATGGGTTTTGGCCACT-GACTGACCCATTTACCATCATTTCATGA
p38α-MAPK bottom-509	CCTGATGAATGATGGTGAAATGGGTCAGTCA-GTGGCCAAAACCCATTTTCAGTCCATCATTTCATC
p38α-MAPK top -709	TGCTGATAAGGAACTGAACATGGTCAGTTTT-GGCCACTGACTGACTGACCATGCAGTTCCTTAT
p38α-MAPK bottom -709	CCTGATAAGGAACTGCATGGTCAGTCAGTCA-GTGGCCAAAACCTGACCATGTTTCAGTTCCTTATC
MGAT3 top –control (ct)	CATTTCTCAGTGCTATAGAGTTTT
MGAT3 bottom -ct	TCTATAGCACTGAGAAATGCGGTG
MGAT3 top -T1	TATTTCTGCGCACCAAGGCGTTTT
MGAT3 bottom -T1	GCCTTGGTGCGCACGAAATACGGTG
MGAT3 top –T2	CGAGTATTTCTGCGCACCAAGGCGTTTT
MGAT3 bottom –T2	TGGTGCGCACGAAATACTCGCGGTG

2.1.6 Versuchstiere

Beide Geschlechter der nachfolgenden Mausstämme wurden bei Wasser und Futter *ad libitum* bei einem 12 h Tag-Nachtrhythmus in offener Käfighaltung gezüchtet. In einem Alter von 4 bzw. 9 Monaten wurde der Phänotyp der Tiere analysiert. Des Weiteren wurden genetische Manipulation in einem Monate alten Mäusen überprüft und Embryonen zur Anfertigung von neuronalen Primärkulturen verwendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte mit der Lizenz 40/2014 und 49/2016 gemäß den Tierschutzgesetzen des Saarlandes, auf Basis der europäischen Richtlinien.

2.1.6.1 p38 α -MAPK Deletion im AD-Modell der Plaqueformation

Um p38 α -MAPK in Neuronen zu deletieren, wurden p38 gefloxe (lox) Mäuse mit loxP-site flankiertem mapk14 Gen (Nishida et al., 2004) vom BioResource Center (RIKEN Tsukuba Institute, Japan) importiert und mit Nex-Cre *knock-in* Mäusen verpaart. Nex-Cre Mäuse exprimieren die Cre Rekombinase unter Kontrolle der regulatorischen Sequenz des Genes nex (auch MATH2 oder NeuroD6 genannt), welches für ein neuronales *basic helix-loop-helix* (bHLH) Protein kodiert und eine hohe Expressionsstärke in glutamatergen Prinzipalneuronen, also exzitatorischen Neuronen, wie den pyramidalen Neuronen im Cortex und den Körnerzellen im Hippocampus (Goebbels et al., 2006) aufweist. Diese Tiere wurden freundlicher Weise von K. Nave, (Max-Planck-Institut für Medizin, Göttingen, DE) bereitgestellt. Die aus der Verpaarung resultierenden Genotypen a) p38^(lox/wt)-Cre^(Cre/wt) und b) p38^(lox/lox)-Cre^(Cre/wt), also Tiere mit a) heterozygotem und b) homozygotem ko von p38 α -MAPK in Neuronen wurde mit Geschwistern der Genotypen c) p38^(lox/wt)-Cre^(wt/wt) bzw. p38^(lox/lox)-Cre^(wt/wt), also p38 α -MAPK wt Mäusen verglichen. Für den Nachweis des erfolgreichen p38 α -MAPK ko wurden 4 Wochen alte Mäuse des Genotyps a) mit c) verglichen, da hier von der maximal verbleibenden Genexpression der p38 α -MAPK ausgegangen wird. Die Untersuchungen der Sekretasen-Aktivität wurden zusätzlich zwischen 4 Monate alten Mäusen des Genotypes a), b) und c) verglichen.

Um die Effekte von Zelltyp-spezifischer p38 α -MAPK Aktivität im Zusammenhang mit der AD-Pathogenese zu untersuchen, wurde das APP/PS1-transgene (APP/PS1^{tg}) AD-Mausmodell verwendet. Diese APP/PS1-zweifach transgenen Mäuse co- und über-exprimieren das humane APP695 (KM670/671NL) mit schwedischer Mutation und mutiertem PS1 (L166P) unter der Kontrolle des Neuronen spezifischen Thy1-Promotors (Radde et al., 2006) und wurden freundlicher Weise von Matthias Jucker (Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen, DE) bereitgestellt. Diese Mauslinie mit C57BL/6J Hintergrund bildet zerebrale amyloide Ablagerungen ab einem Alter von 2 Monaten. Nach 3 bis 4 Monaten finden sich diese Ablagerungen im Hippocampus und später im Striatum, Thalamus und Hirnstamm. Über kognitive Defizite dieser Tiere im Morris *water maze* wurde in einem Alter von 7 Monaten berichtet (Serneels et al., 2009). Eine verminderte Anzahl an Neuronen kann z.B im

Gyrus denatus im höheren Lebensalter von 17 Monaten detektiert werden (Rupp et al., 2011). Die Anzahl der Mikroglia im Neocortex erhöht sich ab einem Alter von 8 Monaten, begleitend zur A β -Ablagerung bis zu einem Dreifachen und auch Radde und Kollegen konnten kognitive Defizite im Alter von 8 Monaten nachweisen (Radde et al., 2006). Das APP/PS1^{tg} Mausmodell mit Neuron-spezifischer Deletion von p38 α -MAPK im Neocortex und Hippocampus wurde durch Verpaarung von APP/PS1^{tg}, p38^(lox/lox) und Nex-Cre^(wt/wt) etabliert. Um nach genetischer Manipulation der neuronalen p38 α -MAPK Expression einen eventuell belastenden Phänotyp im AD-Mausmodell auszuschließen, wurden zunächst APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK heterozygote ko Tiere gezüchtet. Zudem ist die Zucht homozygoter ko Tiere zeit- und kostenintensiv, um richtungsweisende Ergebnisse zu erzielen wurde daher eine Pilotstudie an 4 Monate alten APP/PS1^{tg} Tieren mit heterozygotem p38 α -MAPK ko durchgeführt und mit APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwistern verglichen. Da der Phänotyp der 4 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK heterozygoten ko Mäuse unbelastet und die A β -Pathologie verbessert war, wurde für die Studien in 9 Monate alten Mäusen lediglich APP/PS1^{tg} Tiere mit homozygoter Deletion an p38 α -MAPK verwendet und mit APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt verglichen. Für den Verhaltenstest wurden zusätzlich APP/PS1^{wt} p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{wt} p38 α -MAPK ko Geschwister in die Studie einbezogen.

2.1.6.2 ATG5-Mausmodell

Für die Kontrollexperimente zur Überprüfung der ATG5-vermittelten Autophagie, wurden ATG5^(lox/lox)-CamK2 α -CreERT Mäuse in einem Alter von 2 Monaten verwendet bzw. aus ATG5^(lox/lox) Muttertieren Embryonen der Embryonalwoche (E)14-17 entnommen und aus dem Hirn Neuronen für in vitro Experimente präpariert. Die Mäuse überexprimieren das Fusionsprotein Cre-Estrogenrezeptor (ER) T2 in neuronalen Zellen unter der Kontrolle des murinen *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha* (CamK2 α) Promotors (Madisen et al., 2010). Dabei wird das Exon 3 des ATG5 Genes durch loxP Seiten flankiert (Hara et al., 2006). Der CamK2 α Promotor ist vor allem im Cortex und Striatum aktiv. Die Aktivität des Cre-ERT2 Fusionsproteins ist in vivo, durch intraperitoneale Tamoxifen Injektionen (100 μ g/g Körpergewicht/Tag über 5 Tage) induzierbar.

2.1.6.3 p38 α -MAPK Deletion im AD-Modell der Fibrillenformation

Um die pathogene Rolle der p38 α -MAPK im ganzheitlichen und möglichst repräsentativen AD-Mausmodell zu untersuchen, wurde die p38 α -MAPK in Mäusen, die hyperphosphoryliertes Tau überexprimieren, homozygot deletiert. Der Phänotyp der Mäuse wurde in einem Alter von 9 Monaten untersucht. Diese Tau^{tg} Mäuse exprimieren die mutierte Form P301S des humanen Mikrotubuli-assoziierten Proteins, unter der Kontrolle des murinen Prion Protein Promoters. Histologische Analysen zeigen neuronale Degradation im Hippocampus und eine Vergrößerung der Ventrikel (Hirnatrophie) in einem Alter von 8 Monaten, wobei die neuronale Degradation ein Signifikanzlevel in einem Alter von 9 Monaten erreicht. Signifikant verminderte synaptische Funktion ist bereits ab dem 6 Monat nachzuweisen (Yoshiyama et al., 2007).

2.2 Analysen in *vitro*

2.2.1 Konstruktion der p38 α -MAPK kd Zelllinie

Der pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR Vektor aus dem BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector kit wurde zur Etablierung des p38 α -MAPK kd verwendet. Dazu wurden zwei unterschiedliche Abschnitte aus der humanen p38 α -MAPK Sequenz gewählt und mittels Ausbildung der Haarnadelstruktur und Ribonukleinsäure (eng. *ribonucleic acid*, RNA)-Interferenz in das Zellgenom integriert. Die RNA-Interferenz beruht auf einem natürlichen Schutzmechanismus vor Pathogenen, wie beispielsweise doppelsträngiger viraler RNA. In der Molekularbiologie macht man sich das Prinzip dieser Methode zur gezielten Repression bestimmter Zielgene zu nutzen. Die *short hairpin* RNA (shRNA) wird in der Zelle zu einer funktionellen *small interfering* RNA (siRNA) prozessiert und dadurch das Zielgen, hier *mapk14*, supprimiert. Nach der Transfektion wird der Vektor die artifizielle miRNA, welche 100 % Homologie zu der Zielsequenz besitzt, transkribieren und so die Ziel-RNA schneiden. Das pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-negative-Kontrollplasmid (kd-ct) beinhaltet eine nicht-kodierende Sequenz und wurde als Kontrollvektor für den p38 α -MAPK kd verwendet. Die kd Zelllinien kd509 und kd709, sowie die entsprechende Kontrollzelllinie mit dem zirkulären Leervektor pcDNATM6.2-GW/-miR-neg kd-ct wurde gemäß dem nachfol-

genden Protokoll erstellt. Die Sequenzen der DNA Oligonukleotide sind in Tab. 11 aufgelistet.

2.2.1.1 Generation der doppelsträngigen Oligonukleotide und Ligation

Die einzelsträngigen Oligonukleotide der beiden Zielsequenzen für den p38 α -MAPK kd, der kd509-top, kd509-bottom und kd709-top, kd709-bottom, sowie die Kontrollsequenz kd-ct-top, kd-ct-bottom wurden zu doppelsträngigen Oligonukleotide (ds oligos) zusammengelagert. Dazu wurde folgende Anlagerungs-Reaktion bei Raumtemperatur (RT) angesetzt:

Tabelle 12: Anlagerungs-Reaktion zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Reagenz	Menge
top und bottom DNA oligos (200 μ M)	10 μ l
10x Oligo Annealing Puffer	2 μ l
DNase/RNase-freies Wasser	8 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

Dieses Reaktionsgemisch wurde für 4 min bei 95°C inkubiert. Um das Zusammenlagern der top mit den jeweiligen bottom-DNA oligos zu gewährleisten, wurde das Reaktionsgemisch für 10 min bei RT abgekühlt. Die ds oligos wurden auf 10 nM verdünnt und in folgenden Ligationsreaktion eingesetzt:

Tabelle 13: Ansatz des Ligationsreaktion

Reagenz	Probe	Positivkontrolle	Negativkontrolle
5x Ligationspuffer	4 μ l	4 μ l	4 μ l
pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (5 ng/ μ l)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
miR-ds Oligo (10 nM)	4 μ l	-	-
miR-lacZ Kontroll oligos (10 nM)	-	4 μ l	-
DNase/RNase-freies Wasser	9 μ l	9 μ l	13 μ l
T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Die Reaktionsansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis abgestoppt.

2.2.1.2 Transformation in *E.coli*

Für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 50 μ l kompetente *E.coli* TOP10 mit 2 μ l des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Bakterien in einem Wasserbad für 30 s bei 42 °C erwärmt und dann

sofort für 2 min auf Eis gekühlt. 250 µl S.O.C Medium wurde zu den transformierten Bakterien gegeben und für 60 min bei 37 °C und 125 min⁻¹ unter der Inkubationshaube inkubiert, damit die Bakterien sich erholten und das Resistenzgen gegen Blasticidin exprimiert werden konnte. Danach wurden davon 100 µl auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Spectinomycin plattiert. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert, sodass sich bakterielle Kolonien ausbildeten, wobei die Transformationsansätze der Negativkontrolle frei von Kolonien blieben. Anschließend wurden mit einer sterilen Einwegimpföse Spectinomycin-resistente Einzelklone gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Spectinomycin für 7 h bei 37 °C unter der Inkubationshaube bei 125 min⁻¹ angeimpft. Die Verifikation des einklonierten Inserts erfolgte nach Plasmidisolation aus 4 ml der angeimpften Bakterienkultur mittels Minipräparation. Die restlichen 1 ml der angeimpften Bakterienkultur wurde mit 1 ml 50 % Glycerol in einem Cryotube vermengt und als Glycerolstocks bei -80 °C gelagert

2.2.1.3 Kontrolle der Plasmidsequenz nach Minipräparation

Um eine fehlerfreie Transformation zu überprüfen, wurden aus den transformierten Bakterien die vervielfältigte DNA in Form einer Plasmidisolation durchgeführt und die isolierten Plasmide sequenziert. Dazu wurde das Isolations-kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep nach Herstellerangaben verwendet. Um mögliche Mutationen auszuschließen, wurden anschließend die Plasmide mit Insert sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit den erwünschten verglichen. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen, DE) vorgenommen. Bei übereinstimmenden Sequenzen, wurden die entsprechenden Glycerolstocks zur Animpfung einer 500 ml Übernachtskultur verwendet. Dazu wurden die gefrorenen Glycerolstocks auf Eis angetaut und mit einer sterilen Impföse über die Eisoberfläche geschabt. Mit diesem Material wurden schließlich LB-Agarplatten, mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum, bestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Kulturen wurde dann ein Einzelklon gepickt und eine 500 ml Übernachtskultur angeimpft.

2.2.1.4 Plasmidvervielfältigung und Maxipräparation

Aus den Übernachtskulturen wurde das Plasmid mittels einer Maxipräparation isoliert, um dieses anschließend in die gewünschten Zellen zu transfizieren. Dazu wurde die Übernachtskultur bei 4000 xg für 15 min bei 4 °C pelletiert und die Plasmidaufreinigung mittels des Maxipräparations PureLink® HiPure Plasmid Filter DNA Purification kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Herstellung der sterilen Kulturmedien, die Vorbereitung der Kulturgefäße und die Kultivierung der Zellen erfolgten in sterilen Werkbänken mit laminarer Luftströmung. Die Zellkulturmedien wurden vor dem Gebrauch mit den jeweiligen Zusätzen versehen und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte je nach Zelldichte auf 6- oder 12-Well Platten, sowie in 25-, 75- und 175 cm² Polystyrol-Zellkulturflaschen mit BelüftungsfILTER in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeitssättigung. Soweit nicht anders vom Hersteller empfohlen, wurden alle Medien und Reagenzien bei 4 °C gelagert. SHSY5Y Neuroblastomazellen wurden von LGC Standards GmbH (Wesel, Germany) bezogen und in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Antistreptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Zufuhr in Polystyrol-Flaschen kultiviert. Diese adhärent wachsenden Zellen sind eine Fusion aus humanen Karzinomzellen und Neuronen.

2.2.2.1 Kultivierte Zelllinien

Verschiedene SHSY5Y Zelllinien wurden etabliert. 1) SHSY5Y Zellen mit kd von p38 α -MAPK Expression wurden durch Transfektion der Zellen mit kd-ct, kd509 und kd709 Vektoren etabliert; 2) SHSY5Y Zellen mit Überexpression des wt und dominant-negativen (DN) humanen ATG5 durch Transfektion mit dem Expressionsvektor, bereitgestellt von N. Mizushima (Addgene Plasmids #22948 und #22949) (Mizushima et al., 1998). Um Unterschiede in der Autophagie Aktivität zu untersuchen, wurde Zelllinie 2) über 24 h mit dem Autophagie Aktivator Rapamycin in einer Konzentration von 0.2 μ g/ml behandelt. 3) SHSY5Y Zellen mit Überexpression von ATG5 (wt und DN) wurden zusätzlich mit kd-ct und kd709 Vektoren transfiziert. Des Weiteren wurden diese Zellen mit und ohne den

Autophagieinhibitor 3MA in einer Konzentration von 1 mM über 16 h kultiviert; 4) Um die Effekte von p38 α -MAPK auf die A β -Sekretion zu überprüfen, wurden die APP^{tg} SHSY5Y Zellen mit p38 α -MAPK kd Vektoren (kd-ct, kd509 und kd709) transfiziert.; 5) Um die Effekte von p38 α -MAPK auf die Autophagie zu untersuchen, wurde zum einen in der LC3-GFP-RFP-transgenen Reporterzelllinie für Autophagie die Aktivität von p38 α -MAPK durch Applikation von 0, 10 und 30 μ M SB203580 über 2 h inhibiert (Kimura et al., 2007) und zum anderen wurde eine Primärkultur aus embryonalen Neuronen für 3 d mit 800 nM Tamoxifen kultiviert, nach einer Woche wurde zusätzlich der p38-MAPK Inhibitor SB203580 (30 μ M) für 16 h inkubiert; 6) Um den Zusammenhang von p38 α -MAPK und MGAT3 zu untersuchen, wurde zunächst mittels der CRISPR-Cas9-Technik eine MGAT3 kd Zelllinie mit zusätzlicher Selektion über co-Transfektion des DsRed Vektors pCEP4 etabliert und diese anschließend mit den Vektoren für den p38 α -MAPK kd transfiziert.

2.2.3 Transfektion mit Lipofectamine 2000

Die Integration der genetisch modifizierten DNA in die Zielzellen erfolgte mittels Lipofectamine 2000. Die Plasmid-DNA wird dabei in wässriger Lösung von Liposomen umschlossen, welche anschließend mit der Plasmamembran der Zielzelle fusionieren und so die Fremd-DNA in das Zytoplasma einschleusen. Zur Transfektion von SHSY5Y Zellen wurden 1 Mio. Zellen in DMEM +10 % FCS in 6-Wellplatten ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Opti-Mem gewaschen und 10 μ l Lipofectamine-Reagenz in 240 μ l Opti-Mem verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. 5 μ g der Plasmid-DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 250 μ l Opti-Mem mit dem Transfektions-Reagenz vereinigt. Nach Inkubation von 20 min bei RT wurde der Liposomen-Plasmid-DNA-Komplex tropfenweise zu den Zellen gegeben und nach 24 h entfernt. Die Transfektion wurde mittels Applikation der spezifischen Selektionsantibiotika von 5 μ g/ml Blastidicin oder/und 250 μ g/ml G418 oder/und 300 μ g/ml Hygromycin etabliert. Die für den p38 α -MAPK kd-transfizierten Zellen exprimieren das EmGFP. Zum Nachweis der grünen Fluoreszenz wurden die pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR Zellen auf Objektträger kultiviert, mit 2 % PFA in PBS für 10 min Bei RT fixiert, mittels *Antifade Mounting Medium*, welches den blauen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-

phenylindol (DAPI) zum Anfärben der Zellkerne beinhaltet, eingedeckt und mit dem Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Des Weiteren wurden alle genetischen Modifikationen durch quantitative *Western blot* Analysen der jeweiligen Proteine überprüft.

2.2.4 CRISPR-Cas9-Technik

Die Technik der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/CRISPR assoziierte Gene (Cas) dient der Erzeugung gentechnisch veränderter Organismen. Diese Methode beruht auf einem Abwehrmechanismus des bakteriellen Immunsystems, schützt diese vor eindringende Viren und verleiht ihnen so eine permanente Resistenz gegenüber diesen Erregern. CRISPRs sind palindrome, sich wiederholende DNA-Abschnitte, die von exogenen DNA Segmenten, den sogenannten *spacern*, unterbrochen werden. Die *spacer* sind dabei homolog zu DNA-Sequenzen von Viren und werden nach einem viralen Befall als Erkennungssequenzen in das bakterielle Genom integriert. Bei dem CRISPR-Cas-System spielen drei Komponenten eine wichtige Rolle: 1) die Cas9 Nuklease ist eine doppelsträngige DNA Endonuklease und wird durch zwei kurze sogenannte guide RNAs, 2) der zum Zielgenkomplementären CRISPR RNA (crRNA), also den *spacern* und 3) der transaktivierenden crRNA (tracrRNA), zum spezifischen Genloci transportiert. Die crRNA hybridisiert dabei mit den tracrRNA unter Ausbildung einer Haarnadelstruktur. Zusammen mit Cas9 bilden sie einen Ribonukleinkomplex welcher letztendlich einen Doppelstrangbruch der DNA bewirkt und damit eine Deletion in der Zielsequenz hervorruft. Das sogenannte *protospacer adjacent motif* (PAM) kommt ausschließlich in der DNA Zielsequenz vor. PAM ist nicht in der crRNA enthalten und dient dadurch der Erkennung der Ziel DNA. Dieses Prinzip des *gene editings* ist in Abb.8 dargestellt (entnommen von Seite 2 aus (Lifetechnologies, 2014)).

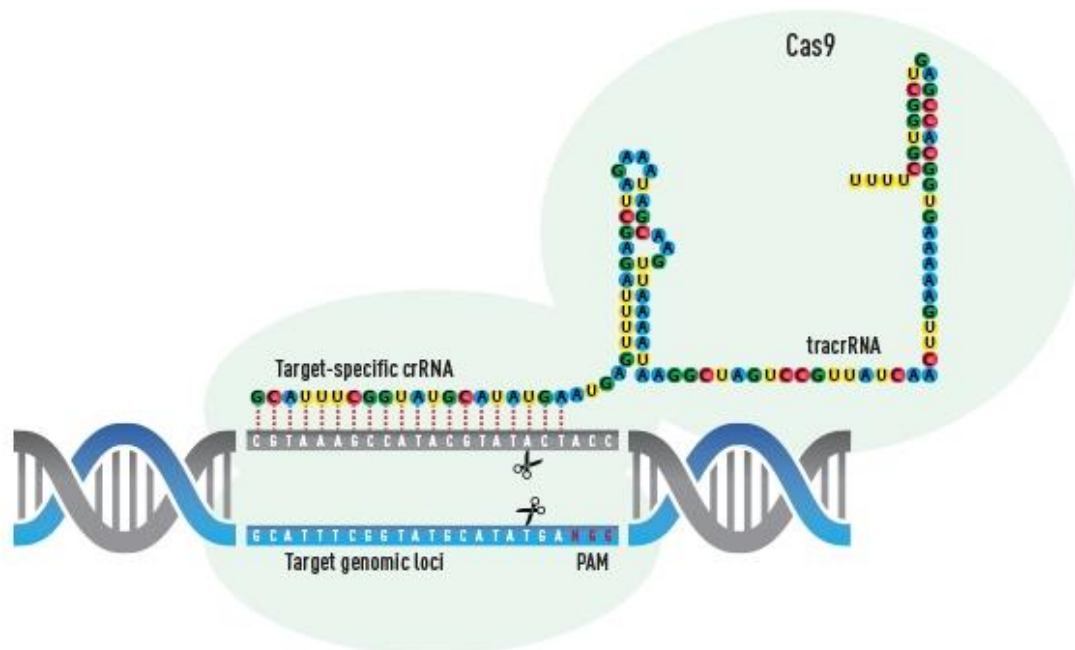


Abbildung 8: CRISPR/Cas9 Methode. Die Zielsequenz-spezifische CRISPR RNA (target-specific crRNA) bildet mit der trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA) eine Haarnadelstruktur aus und leitet den so formierten Cas9 Komplex zur genomischen Zielsequenz. Die Endonuklease Cas9 bewirkt dort nach Erkennung der Sequenz über das protospacer-adjacent motif (PAM) einen Doppelstrangbruch der DNA und deletiert so die Zielsequenz (Abb. entnommen aus [Life-Technologies, 2014 #1331]).

Mit der CRISPR-Cas9-Technik wurde der kd von MGAT3 durchgeführt. Dazu wurden die in Tab.11 gelisteten Zielsequenzen von 20 Basenpaarlänge und GTTTT- bzw. CGGTG-Überhängen für das T1 und das T2 Konstrukt designt. Als Kontrollkonstrukt wurden die in dem GeneArt®CRISPR Nuclease Vector kit mitgelieferten ds oligos (siehe Tab. 11) verwendet. Dazu wurde das Methodenprotokoll wie in Kapitel 2.2.1.1-2.2.1.4 mit folgenden Abwandlungen angewendet. Der Ligationsansatz sah wie folgt aus:

Tabelle 14: Ligationsansatz der CRISPR-Cas9-Technik

Reagenz	Probe	Negativkontrolle
5x Ligationspuffer	4 µl	4 µl
Linearisierter GeneArt® CRISPR Nuclease Vector	2 µl	2 µl
ds oligonucleotide (5 nM)	2 µl	-
DNase/RNase-freies Wasser	11 µl	13 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl

Für die Transformation mittels Hitzeschock wurden 50 µl kompetente *E. coli* TOP10 mit 3 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde 1 µl des im kit enthaltenen pUC19 Plasmids

als Positivkontrolle zu 50 µl kompetenten E.coli TOP10 zugefügt und ebenfalls für 30 min auf Eis inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben eingehalten. Danach wurden 50 µl der transformierten Bakterien und für die Positivkontrolle mit pUC19 20 µl auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Die Kontrolle der Plasmidsequenz nach Minipräparation, sowie die Plasmidvervielfältigung mit anschließender Maxipräparation, wurden wie in den Kapiteln 2.2.1.3 und 2.2.1.4 durchgeführt. Die Transfektion wurde wie in Kapitel 2.2.3 mit 3 µg der Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 250 µl Opti-Mem durchgeführt. Da der GeneArt® CRISPR Nuclease Vector kein Resistenzgen für die Kultivierung der transfizierten Zellen besitzt, überwuchsen die nicht transfizierten SHSY5Y Zellen die transfizierten Zellen sehr schnell, sodass eine Co-Transfektion des GeneArt® CRISPR Nuclease Vektors mit dem pCEP4 Vektor, mit Sequenz für das rot fluoreszierende Gen DsRed und die Antibiotikaresistenz gegen Hygromycin, in einem Verhältnis von 1:4 durchgeführt wurde. Der GeneArt® CRISPR Nuclease Vektor besitzt allerdings die Sequenz für CD4, einem normalerweise mikroglialen Oberflächenmarker des angeborenen Immunsystems. Alle positiv transfizierten Zellen besitzen nun neben der roten Fluoreszenz und der Resistenz gegenüber Hygromycin, den kd von MGAT3 in Form von kdT1 und kdT1 bzw. dessen Kontrollkonstrukt kd-ct sowie die Expression des CD4 Gens. CD4 ist in diesem Fall eine Art Reportergen und kann für eine Isolierung und Aufkonzentrierung der positiv transfizierten Zellen, mittels Separation über magnetische Kügelchen, verwendet werden. Durch durchflusszytometrische Färbung von CD4 kann zusätzlich die Transfektionseffizienz überprüft werden.

2.2.4.1 Anreicherung der transfizierten Zellen über CD4 Dynabeads

Zellen die mit dem GeneArt® CRISPR Nuclease Vektor transfiziert wurden, wurden über einen, an magnetische Kugeln gekoppelten, CD4 Antikörpers isoliert und für weitere Kultivierung angereichert. Dazu wurden die Dynabeads® CD4 Magnetkugeln verwendet. Ca. 1×10^6 transfizierte Zellen wurden mittels Trypsin geerntet und bei 400 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 2 ml Puffer I resuspendiert. Die Zellen wurden erneut bei 400 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und zwei Mal mit Puffer I

gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 900 µl Puffer I resuspendiert und auf Eis platziert. Die Dynabeads® CD4 gekoppelten Magnetkugeln wurden, zur gleichmäßigen Durchmischung, für 3 min bei 20 min⁻¹ auf dem Überkopfrotor bei RT inkubiert. Danach wurden 25 µl der Magnetkugeln in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und für 1 min auf den Magnethalter platziert. Unter Wirkung des magnetischen Feldes wurde der Überstand abgenommen, verworfen und die Magnetkugeln vom Magnethalter entfernt, um sie in 100 µl Puffer I zu resuspendieren. Danach wurden die Magnetkugeln abermals für 1 min in dem Magnethalter eingespannt und der Überstand entfernt. Die Magnetkugeln wurden in 25 µl Puffer I resuspendiert und die Zellsuspension von 900 µl zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation auf dem Überkopfrotor für 30 min bei 4 °C und minimaler Drehzahl. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 1 min in dem magnetischen Halter platziert und der Überstand, welcher Zellen ohne CD4-positive Expression beinhaltet, verworfen. Die Zell-Magnetkugel-Suspension wurde in 500 µl Puffer I resuspendiert und auf dem Überkopfrotor für 2 min bei 20 min⁻¹ gewaschen. Die Reaktionsgefäße wurden erneut im magnetischen Halter platziert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wurde 5-mal wiederholt und das Zell-Magnetkugel-Pellet schließlich in 100 µl Puffer II resuspendiert. Um die Magnetkugel zu entfernen, wurden 10 µl der DETACHaBEAD®CD4 Lösung zu den positiv transfizierten Zelle-Magnetkugel-Suspension gegeben und auf dem Überkopfrotor bei RT für 45 min und minimaler Drehzahl inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße im magnetischen Halter fixiert, 1 min inkubiert und der Überstand, welcher die CD4-positive Zellen beinhaltet, auf ein steriles Reaktionsgefäß übertragen. Die Magnetkugeln wurden in 500 µl Puffer II resuspendiert, die Reaktionsgefäße in dem magnetische Halter fixiert und der Überstand zu den CD4-positive Zellen gegeben. Um die maximale Ausbeute zu erhalten, wurde dieser Vorgang dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen bei 400 xg für 6 min bei 4 °C zentrifugiert und die Zellen in 2 ml Kulturmedium (DMEM + 10 % FCS + 300 µg/ml Hygromycin) resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 8 ml Kulturmedium bis zum Erreichen einer 90 %igen Konfluenz in Kultur genommen. Anschließend wurde mittels durchflusszytometrischer Färbung von CD4 der Transfektionserfolg überprüft.

2.2.4.2 Durchflusszytometrische Färbung

Mit Hilfe des *fluorescence activated cell sorting* (FACS), auch Durchflusszytometrie genannt, kann eine spezifisch gefärbte Zellpopulation nach ihren einzelnen Antigenen und Zelltypen aufgeteilt werden. So können beispielsweise CD4-positiven Zellen, also die SHSY5Y Zellen mit erfolgreicher CRISPR-Cas9 Transfektion, aus der Grundpopulation aller kultivierten MGAT3 kd-ct, kdT1 und kdT2 Zellen sichtbar gemacht und die prozentuale Anzahl ausgewertet werden. Eine Querschnittsverengung im Probenkanal ermöglicht, es jede Zelle und damit die entsprechenden an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenzen, einzeln über Laser einer bestimmten Wellenlänge anzuregen. Äquivalent wird jegliches emittierte Licht über bestimmte Filter detektiert und so den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen zugeordnet. In jeder durchgeführten durchflusszytometrischen Messung wurde eine Kompensation erstellt. Nur so ist gewährleistet, dass die einzelnen Fluoreszenzen eindeutig zu differenzieren und falsch positive Signale auszuschließen sind. Das bedeutet, dass jede verwendete Fluoreszenz einzeln präsentiert wurde und so die Spektren der entsprechenden Fluorochrome zugeordnet wurden. In diesem Fall entsprach die rote Autofluoreszenz dem Absorptions- und Emissionsspektrum von APC und die CD4-positiven Zellen wurden an das Fluorophor PerCP gekoppelt. Die Zellen wurden abtrypsiniert und das Pellet nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 8 min bei 4 °C in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl 1:100 in Trypanblau verdünnt und von der Verdünnung 10 µl in die Neubauerzählkammer geladen. Dieser Farbstoff kann nur durch defekte Zellmembranen diffundieren, dort an Proteinen binden und ermöglicht so die Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Die Zellzahl pro 1 ml wurde durch mändelförmiges Auszählen der lebenden Zellen in allen vier Großquadranten ermittelt. Dazu wurden die Zellzahlen der vier Großquadrate addiert und durch vier dividiert. Dieses Ergebnis muss nun mit dem Verdünnungsfaktor (bei 1:100= 10^2) und dem eingesetzten Volumen (bei 10 µl aus 1000 µl= 10^4) multipliziert werden. Schließlich wurden 200 000 Zellen pro Färbereaktion eingesetzt. Die aus der Vitalfärbung ermittelte Zellzahl musste nun über das einzusetzende Volumen an die gewünschte Zellzahl angepasst und ggf. mit FACS-Puffer verdünnt werden. Dazu wurden dreimal 200 000 Zellen in einem Ge-

samtvolumen von 96 µl FACS-Puffer in je ein Durchflusszytometrierröhrchen verteilt. Ein Ansatz wurde nicht gefärbt und diente als Referenz der, durch die DsRed Transfektion verursachte, rote Autofluoreszenz der Zellen. Der zweite Ansatz wurde einer Isotypfärbung und der dritte Ansatz der CD4-Färbung unterzogen. Dazu wurde der PerCP-Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper aus der Maus gegen das humane CD4 (BD:550631) und die entsprechende PerCP-Fluoreszenz-gekoppelte Isotypkontrolle aus der Maus gegen IgG1 kappa (BD:349044) in einer Konzentration von 20 µl pro 1 Mio. Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden untransfizierte SHSY5Y Zellen für die Kompensation geerntet. Die Zellen wurden in FACS-Puffer, bzw. in FACS Puffer mit CD4 Antikörper bzw. in FACS Puffer mit Isotypkontrolle für 40 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde jeder Probe 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben, gevortext und bei 1400 rpm, bei 4 °C für 4 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt die Zellen erneut gewaschen, das Pellet in 100 µl FACS-Puffer mit 1 % PFA fixiert und die Zellen durchflusszytometrisch mit dem FACS Canto II und der FACS Diva Software analysiert. Die Zellen wurden mittels der „*for-* und *sideward scatter*“ als Population eingegrenzt und der prozentuale Anteil der CD4-positiven Zellen aus der Gesamtpopulation ermittelt.

2.2.5 Isolation der zellulären Membranfraktion

Die konfluenten Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, durch Inkubation mit Trypsin für 1 min bei 37 °C vom Gefäßboden abgelöst und die enzymatische Reaktion mit gleichem Volumen DMEM + 10 % FCS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 300 xg, 8 min, 4 °C pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Sucrosepuffer resuspendiert. Zur Homogenisierung auf Eis wurde die Suspension zunächst 10x durch eine 24-G Kanüle und anschließend 10x durch eine 27-G Kanüle passiert. Um die nukleäre Fraktion zu entfernen, wurde das Homogenat nach publiziertem Protokoll (Grimm et al., 2011) bei 1000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert. Der resultierende post-nukleäre Überstand wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und erneut bei 10000 xg bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Beckman-Coulter Reaktionsgefäß übertragen und die Membranfraktion mit Hilfe eines TLA-55 Rotors in einer OPTIMAX Ultrazentrifuge bei 186 000 xg,

75 min und 4°C pelletiert. Der geklärte Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl β- oder γ-Sekretasen-Puffer resuspendiert.

2.2.6 Ernten der Zellen für immunologischen Proteinnachweis

Wurden die Zellen in 6-Wellplatten kultiviert, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 60 µl Radioimmunoprecipitations-Assay Puffer (RIPA) mit Proteaseinhibitorcocktail zugegeben. Die 6-Wellplatten wurden für 10 min auf einem Orbitalschüttler auf Eis inkubiert, die Zellen mit einem Zellschaber von der Polystyroloberfläche abgelöst und schließlich in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Homogenisierung erfolgte durch Ultraschall mittels eines Sonifikators für 10 s bei 40 % und auf Eis bei 2 Zyklen. Die Proben wurden anschließend bei 16 100 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf ein neues Reaktionsgefäß und die Proteinkonzentration dieses Überstandes wurde, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, ermittelt. Wurden die Zellen in Polystyrolflaschen kultiviert, wurden diese mit 3 ml Trypsin bei 37 °C von der Oberfläche abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit 3 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt, um anschließend die Zellen bei 1200 rpm für 8 min bei 4 °C zu pelletieren. Das Zellpellet wurde zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und in dem entsprechenden Lysispuffer resuspendiert. Das Homogenisieren erfolgte durch je 10-maliges Aspirieren mit einer 24-G und anschließend mit einer 27-G Kanüle auf Eis. Das Zelllysate wurde nun 20 min auf Eis im RIPA Puffer auf einem Orbitalschüttler inkubiert und anschließend die unlöslichen Bestandteile bei 16 100 xg für 10 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde auf eine neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde wie folgt ermittelt.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in homogenisierten Zell- oder Gewebeproben wurde die Bradford-Messung angewendet. Die Änderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 von 465 zu 595 nm, nach Bindung an Proteine in saurem Milieu, wird bei dieser photometrischen Messung ausgenutzt. Die Proteinsuspension wird, je nach zu erwartender Proteinmenge (1:20 -1:400) verdünnt und dann 1:10 mit dem 1x Bio-Rad Protein Assay Färbepuffer in eine 96-Well Platte pipettiert. Im Anschluss erfolgt

die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm. Die zu bestimmende Proteinkonzentration liegt dabei im Mikrogramm pro Milliliter Bereich. Die Kalibrierkurve wurde mittels einer Verdünnungsreihe von Rinderserum erstellt.

2.2.8 Aktivitätsmessung der β - und γ -Sekretase

Um den Einfluss der p38 α -MAPK auf β - und γ -Sekretasen-Aktivität zu untersuchen, wurde eine Fluoreszenzmessung durchgeführt und die Enzymaktivitäten über eine Zeitdauer von 6 h dokumentiert. Dazu wurde die Membranfraktion aus den Zellen, wie in Kapitel 2.2.5 beschreiben, isoliert und mit dem entsprechenden Sekretasen-spezifischen Substraten, dessen Spaltungsprodukte fluoreszierten, inkubiert. Zur Messung der β -Sekretasen-Aktivität wurde die Membranfraktion in 200 μ l β -Sekretasen-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt gemäß Kapitel 2.2.7 bestimmt. Als finale Konzentration wurden 0.1 mg/ml Membranproteine, 10 % DMSO und 8 μ M β -Sekretasen-Substrat als Triplikate in eine schwarze 96-Lochplatte pipettiert. Zur Messung der γ -Sekretasen-Aktivität wurde die Membranfraktion in 500 μ l γ -Sekretasen-Puffer resuspendiert. Als finale Konzentration wurde hier 1 mg/ml Membranprotein und 8 μ M γ -Sekretasen-Substrat eingesetzt. Beide Enzymreaktionen wurden bei 37 °C durchgeführt und die Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Probe wurde über 73 Zyklen mit 5-minütigen Intervallen mit dem Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader gemessen. Die Fluoreszenzintensität des ersten Zyklus wurde als Hintergrund erachtet und von den nachfolgenden Werten subtrahiert. Die enzymatische Aktivität über die prozentuale Steigerung der Fluoreszenzintensität über die Zeit hinweg berechnet.

2.2.9 Gelelektrophorese

Zur Proteinauftrennung wurden die Proben auf ein 10-12 %iges, diskontinuierliches, denaturierendes Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) aufgetragen. Ein diskontinuierliches SDS-PAGE besteht aus einem leicht sauren Sammel- und einem basischen Trenngel (Laemmli, 1970). Die Proteine wandern in das Sammelgel, in dem sie zu einer scharfen Bande konzentriert werden. Anschließend durchwandern die Proteine das engerporige Trenngel, um in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt zu

werden. SDS ist ein anionisches Detergenz und lagert sich unspezifisch an alle Proteine an, dadurch zerstört es die nichtkovalenten Wechselwirkungen und linearisiert die Proteine. Die Gele wurden nach Tab. 15 in den entsprechenden Konzentrationen angefertigt und in einem Mini Trans-Blot® cell Elektrophorese-System mit 500 ml SDS-PAGE Tris-Glycin Laufpuffer installiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung der angefertigten Tris-Glycin Gele (Menge für 2 Gele)

Chemikalie	5 % Sammelgel	10 % Trenngel	12 % Trenngel
Bisacrylamid 30	840 µl	6450 µl	8000 µl
1M Tris/HCl [pH6,8]	1880 µl	-	-
1M Tris/HCl [pH8,8]	-	7500 µl	7500 µl
dH ₂ O	2200 µl	4950 µl	3400 µl
20 % SDS	25 µl	97,5 µl	97,5 µl
10 % APS	50 µl	195 µl	195 µl
TEMED	6 µl	24 µl	24 µl

Vor der Auftrennung wurden die Proteinproben mit 3x SDS-PAGE Ladepuffer gemischt, 5 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis 1 min gekühlt und kurz abzentrifugiert. Zur Schätzung des Molekulargewichtes der Proteine, wurden neben den Proben 4 µl des Größenstandards Pageruler Prestained Protein Ladder aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V solange fortgesetzt, bis die Front des Farbstoffs Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte. Lediglich für die Detektion von APP und Aβ wurden kommerzielle 10-20 % pre-cast Tris-Tricin Gradienten-Gele in einem XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresesystem mit 500 ml SDS-PAGE Tris-Tricin Laufpuffer installiert.

2.2.10 Proteintransfer mittels *Western blot*

Um die aufgetrennten Proteine zu spezifizieren, wurden die Proteinbanden von dem SDS-Polyacrylamidgel über ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose (NC)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Trägermembran transferiert und so immobilisiert. Hydrophobe Wechselwirkungen ermöglichen das Anhaften der Proteine an der Membran. Diese können später über Antikörper detektiert werden. PVDF-Membranen wurden vor dem Proteintransfer durch 30-sekündige Inkubation in 100 % Methanol aktiviert. Der Transferpuffer wurde bei 4 °C gekühlt und das zu verwendende Filterpapier sowie die Sandwich-Schwämme darin äquilibriert. Die *Western blot* Apparatur XCell SureLock™ Mini-Cell wurde bestehend aus Schwämmen, Fil-

terpapier, dem Gel und der Trägermembran, nach Herstellerangaben zusammengebaut. Die Transferkammer wurde mit gekühltem Transferpuffer befüllt und der Proteintransfer bei 250 mA für 60 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran in TBST für 10 min bei RT gewaschen.

2.2.11 Immunologische Proteindetektion

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit 10 % Magermilch (w/v) in 1x PBS (bei *Griffonia simplicifolia* II (GSLII), einem an Lectin bindenden Antikörper, wird Milch durch BSA ersetzt) für 1 h auf einem Horizontalschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in 1 % Magermilch (w/v) in 1x PBS über Nacht bei 4°C auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen. Der Primärantikörper wurde über einen HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 1 % Magermilch (w/v), durch Inkubation für 1 h bei RT auf dem Horizontalschüttler, gekoppelt. Die entsprechenden Antikörper und ihre Konzentrationen sind in Tab. 6 und 7 aufgelistet. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal, wie beschrieben, gewaschen. Um die markierten Proteine detektieren zu können, wurde die Membran in *Western Lightning Plus ECL KIT* inkubiert. Dazu wurden *Enhanced luminol Reagent Plus* und *Oxidizing Reagent Plus* in gleichem Volumen vermengt und auf die Membran aufgetragen. Nun wurde die Membran gleichmäßig für 1 min in der Luminollösung inkubiert. Überschüssige Luminollösung wurde entfernt und die Chemolumineszenz mit Hilfe von Amersham Hyperfilm ECL in einer Dunkelkammer detektiert. Kodak GBX Entwickler und Fixierer wurden verwendet, um Signale sichtbar zu machen und dauerhaft zu erhalten. Die *Western blot* Filme wurden mit dem Epson Perfection V700 Fotoscanner eingescannt. Die densitometrische Analysen der Bandenintensitäten wurden mit der Image-Pro PLUS Software, Version 6.0.0.260 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD) durchgeführt. Für jede Probe wurde das Proteinlevel als Verhältnis von Zielprotein und einer internen Ladekontrolle berechnet. Als interne Ladekontrolle wurde je nach Bandengröße und Ursprung (Maus bzw. Kaninchen) des Primärantikörpers gegen das Zielprotein die Ladekontrolle α -Tubulin oder β -Actin gewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Größe des Zielproteins und die Spezies des Ur-

sprungs möglichst gut unterscheiden. Alle *Western blots* mit Zelllysaten wurden wie in Kapitel 2.2.9 und 2.2.10 geschildert durchgeführt. Der *Western blot* für A β wurde mit folgenden Änderungen durchgeführt. Um den Effekt von p38 α -MAPK auf die A β -Sekretion zu untersuchen, wurden die APP^{tg}-p38 α -MAPK kd-ct, kd509 und kd709 SHSY5Y Zellen in 6-Wellplatten kultiviert und das FCS-beinhaltende Kulturmedium, nach einmaligem Waschen mit PBS, durch 1 ml serumfreies Medium ersetzt. Nach 16 h wurde das Medium abgenommen und die eventuell im Medium enthaltenen Zellen bei 1200 xg für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Zellen nach Kapitel 2.2.5 geerntet und die Proteinkonzentration des Zelllysats nach Kapitel 2.2.6 bestimmt. Die Proteine im Medium wurden in einem 10-20 % vorgefertigten Gradientengel aufgetrennt. Der Proteintransfer von APP und A β erfolgte ausschließlich auf NC-Membranen bei 300 mA und 45 min. Nach dem Transfer wurde die NC-Membran für 1x 5 min in 1x PBS bei 600 Watt gekocht. Dies macht die Proteine auf der NC-Membran zugänglich für die folgende Immunologische Detektion von APP und A β . Dazu wurde der aus der Maus gewonnene, gegen das humane A β gerichtete monoklonale Primärantikörper W0-2 verwendet. Für jede Probe wurde das Proteinlevel als Verhältnis von Zielprotein und dem sezernierten APP als interne Kontrolle berechnet.

2.2.12 Präparation der lysosomalen Fraktion

Die Methode der Fraktionen-Separation wurde, von bereits publizierten Protokollen (Taguchi et al., 2000; Liu et al., 2010), mit kleineren Abwandlungen übernommen. Die kultivierten SHSY5Y Zellen wurden mit Trypsin geerntet und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C mit gekühlten Reagenzien durchgeführt. Die Zellen wurden in dem HB Puffer versetzt mit dem Proteaseinhibitorcocktail in einem Volumen von 1×10^8 Zellen/ml. Zur Homogenisierung wurde die Suspension zunächst 10-mal durch 24-G Kanüle und anschließend 10-mal durch 27-G Kanüle passiert. Die Homogenate wurden bei 800 xg für 10 min zentrifugiert, um die Zellkerne und intakte Zellen zu pelletieren. Diese wurden anschließend in dem jeweils halben Volumen des HB Puffers homogenisiert. Beide Überstände wurden vereint und für 10 min bei 37 °C unter Zugabe von 2 mM CaCl₂ inkubiert und anschließend bei 3000 xg

für 10 min zentrifugiert, um die großen und schweren Mitochondrien zu entfernen. Der resultierende Überstand wurde für 10 min bei 18 000 $\times g$ zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wurde in 0,5 ml HB resuspendiert und auf 4 ml 30 %iges iso-osmotisches (pH 7,4) Percoll auf 0,5 ml 2,5 M Sucrose geschichtet. Diese Schichtlagen wurden anschließend bei 4 °C für 40 min und 44 000 $\times g$ zentrifugiert. Der resultierende Gradient aus 4 Schichten wurde vorsichtig mit ca. 0,9 ml/Fraktion von oben abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentrationen wurden wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben gemessen und *Western blot* Analysen durchgeführt. Dazu wurde das Standardprotokoll unter Verwendung des lysosomalen Markers LAMP1 und des nicht-lysosomalen Markers Calnexin BACE und β -Actin durchgeführt.

2.2.13 Co-Immunopräzipitation

Die Interaktion von Proteinen kann über Co-Immunopräzipitation (COPI) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein immunologisches Verfahren, bei dem aus einer Proteinsuspension über Antikörperbindung, gezielt ein Antigen isoliert und konzentriert wird. Diesen Vorgang nennt man *pull down*. Dazu wird der Antikörper an magnetische Mikropartikel gebunden. Dieser Mikropartikel-Antikörper-Komplex isoliert aus Proteinlysaten ein bestimmtes Protein oder Aminosäure. Durch magnetische Wechselwirkungen, können die Mikropartikel von der konzentrierten Probe getrennt werden. Diese Probe wird nun nach SDS-PAGE und *Western blot* immunologisch untersucht. Ist in dieser Proteinspezifischen Probe ein weiteres Protein auf der Trägermembran detektierbar, besteht sehr wahrscheinlich eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung.

2.2.13.1 BACE *pull down*

Um die potentielle Phosphorylierung von p38 α -MAPK auf BACE zu untersuchen, wurden mögliche Phosphorylierungsstellen für p38 α -MAPK an BACE über den NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) recherchiert. Dazu wurde die humane BACE Sequenz mit der UniProt Zugangsnummer P56817 als Überprüfungssequenz, herangezogen. Serin blieb als einzige mögliche Phosphorylierungsstelle für p38 α -MAPK übrig. Die kd-ct, kd509 und kd709 Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz abtrypsinisiert. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 8 min bei

4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 0,5 ml Lysispuffer A inklusive 1 % Triton-X100 und 2x Proteaseinhibitorcocktail resuspendiert. Zur Homogenisierung wurde das Zelllysate mit einer 24-G Kanüle 10x aspiriert und das Homogenat bei 14 000 xg 10 min 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und die Proteinkonzentration nach Kapitel 2.2.7 bestimmt. Für den *pull down*, also das Isolieren des Zielproteins aus dem Proteingemisch, wurden 1 mg/ml in einem Gesamtvolumen von 200 µl eingesetzt. Vor Formation des Antikörper Mikropartikel Komplexes wurden die Protein G Dynabeads gewaschen. Dazu wurden die Magnetkugeln 40 s gevortext und pro Probe 50 µl in ein Reaktionsgefäß mit geringer Bindungskapazität (Protein LoBind Tube) gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde in einem magnetischen Halter für 2 min inkubiert und der Überstand verworfen. Die gewaschenen Magnetkugeln wurden nun aus dem Halter genommen und in der Antikörper-*pull down*-Lösung, bestehend aus 200 µl PBS + 0,02 % Tween mit 1:50 BACE (Klon D10E5), aufgenommen und 1 h auf einem Überkopfrötor bei minimaler Drehzahl bei RT inkubiert. Der Antikörper Mikropartikel Komplex wurde in dem magnetischen Halter platziert und der Überstand verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Halter genommen und der Antikörper Mikropartikel Komplex in 200 µl PBS + 0,02 % Tween resuspendiert. Die anti-BACE konjugierten Magnetkugeln wurden nochmals im magnetischen Halter platziert und in dem berechneten Volumen Zelllysate (100-500 µl) resuspendiert. Das Zelllysate wurde zuvor einem sogenannten *pre-clearing* unterzogen, bei dem das Zelllysate mit 50 µl gewaschenen Magnetkugeln für 30 min inkubiert wurde. Bei diesem Vorgang binden Proteine unspezifisch an die Magnetkugeln und das verbleibende Zelllysate ist frei von unspezifischen Bindungsproteinen. Die anschließende Inkubation wurde für mindestens 2,5 h bei 4 °C bei minimaler Drehzahl auf dem Überkopfrötor durchgeführt. Aus dem Zelllysate wurde BACE über dessen Antigen an die anti-BACE konjugierten Magnetkugeln gekoppelt und so isoliert. Nach Beendigung der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß in dem magnetischen Halter platziert und das Zelllysate als Überstand verworfen bzw. als Kontrolle des spezifischen *pull down* 20 µl mit 10 µl Ladepuffer auf das SDS-Gel beladen. Um die BACE Proteinlösung zu waschen wurde das Reaktionsgefäß aus dem Halter genommen, das Pellet in PBS + 0,02 % Tween gewaschen und

der Vorgang dreimal wiederholt. Pro Probe wurde 30 µl Ladepuffer zugegeben. Die Proben wurden gevortext, BACE bei 95 °C denaturiert und gleichzeitig von den Mikropartikeln abgelöst. Die Proben wurden abzentrifugiert und zum Beladen des SDS-Gels in dem magnetischen Ständer platziert, sodass beim Laden der Proben in das Gel keine Mikropartikel mit überführt wurden. Der SDS-PAGE Lauf und der *Western blot* Transfer wurden, wie in Kapitel 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben, durchgeführt. Die serielle Immundetektion zur Co-Immunopräzipitation wurde zunächst mit dem Antikörper gegen Phosphoserin bzw. GSLII und anschließend mit dem Antikörper gegen-BACE (Klon D10E5) durchgeführt. Soweit möglich, wurde als Sekundärantikörper der Kaninchen-anti *light chain*-HRP Antikörper verwendet. Dieser, aus der Ziege gewonnene Antikörper, bindet lediglich an die leichten Seitenketten des, aus dem Kaninchen gewonnenen Primärantikörpers und vermeidet dadurch, die für COIP typischen, unspezifischen Signale der schweren Seitenketten nach *pull down* um 55 kDa. Die Menge des phosphorylierten bzw. glykosylierten BACE wurde nach Normalisierung des Phosphoserin- bzw. GSLII Signals gegen das jeweilige BACE Signal analysiert.

2.2.13.2 Threonin *pull down*

Der NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) und die humane Sequenz von MGAT3 mit der UniProt Zugriffsnummer Q09327 wurden verwendet, um potentielle Phosphorylierungsstellen bestimmen zu können. Diese Recherchen belegen, dass MGAT3 theoretisch von p38α-MAPK über Threonin an Stelle 261 phosphoryliert werden kann. Der Threonin *pull down* erfolgte wie unter 2.2.13.1 für BACE beschrieben. Die Verdünnung des Threonin-Antikörpers betrug dabei 1:50. Alle für *Western blot* verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab.6 und 7 aufgelistet.

2.2.14 Quantitative Real-Time PCR

Um auf der RNA-Ebene transkriptionale Veränderungen zu detektieren, wird die Polymerasenkettenreaktion (eng. *polymerase chain reaction*; PCR) durchgeführt. Die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) ist eine auf der herkömmlichen PCR beruhende Methode zur Quantifizierung spezifischer Gentranskripte. Die Quantifizierung wird anhand Fluoreszenzmessungen jeder Probe in einer 96-Wellplatte durchgeführt, die nach jedem PCR-Zyklus, also in Echtzeit, erfasst

wird. Die Amplifikation des PCR-Produktes steht in einem proportionalen Verhältnis zur steigenden Fluoreszenz und die Ermittlung der DNA-Menge erfolgt innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Interkalator und die Reporter-Sonden-basierende qRT-PCR Variante angewendet. Die im Vergleich kostengünstigere Methode, ist die Nutzung von Farbstoffen wie SYBR Green. Diese interkalieren mit doppelsträngiger DNA und die ansteigende Fluoreszenz wird dann aufgezeichnet. Aufgrund der eher geringen Spezifität wird bei diesem Verfahren eine Schmelzkurvenanalyse nach Ende der PCR benötigt. Dabei kann eine zufällige Zusammenlagerung von DNA-Fragmenten oder der Primern selbst, als unspezifisches Nebenprodukt ausgeschlossen werden. Die auf *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) basierende Methode mit den TaqMan-Sonden ist hingegen wesentlich spezifischer. Diese Sonden enthalten neben Oligonukleotiden zusätzlich an einem Ende einen Reporter-Farbstoff, in diesem Fall Carboxyfluorescein (FAM), und an dem anderen Ende einen sog. Quencher, der die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors bei intakter Sonde unterdrückt. Während der PCR-Reaktion bindet die Sonde an die DNA und die DNA-Polymerase trennt den Reporter-Farbstoff von dem Quencher, wodurch die Fluoreszenz ansteigt.

2.2.14.1 RNA-Isolation

Die RNA von SHSY5Y Zellen wurde mittels RNEasy Plus Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert und das Pellet in 50 µl TE-Puffer (im Kit enthalten) eluiert. Die Gesamt-RNA der 0,5 mm dicken Gewebeschnitte des rechten Gehirns wurde in 1 ml Trizol[®] Reagent homogenisiert. Dabei wurde das Maushirngewebe 10-mal durch 24-G Kanüle passiert. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert, bevor sie bei 12 000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert wurden. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 15 s kräftig geschüttelt und 2 min bei RT inkubiert. Um die wässrige von der organischen Phase zu trennen, wurden die Proben bei 12 000 xg, 15 min, 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und gemischt. Die Lösung wurde bei RT für 10 min inkubiert und wieder bei

12 000 xg, 15 min, 4 °C zentrifugiert, um die RNA zu pelletieren. Danach wurde das RNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 7500 xg, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde das RNA-Pellet für 5 min luftgetrocknet, in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und ein DNase-Verdau mit der RQ1 DNase1 mit 1 U/µg durchgeführt. Die Menge und Qualität ($2,0 \pm 0,1$) der RNA wurde mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer bestimmt.

2.2.14.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription des Erststrangs der komplementären DNA (eng. *complementary* DNA; cDNA) wurde mit Hilfe der *SuperScript III Reverse Transcriptase* bzw. M-MLV Transkriptase (Promega) durchgeführt. 11 µl RNA-Probe wurde mit 1 µl *hexamer random primer* (250 ng /µl) und 1 µl dNTPs (je 10 mM) bei 65 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation (10 s 3000 xg) wurden 4 µl des 5x Erststrang-Puffers und 262 µl 0,1 M DTT hinzugefügt und bei RT für 2 min gelagert. 1 µl *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200 Units/µl) wurde als letzte Komponente dazugegeben und der Ansatz bei 42 °C für 50 min erwärmt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70 °C für 15 min.

2.2.14.3 qRT-PCR mittels SYBR Green

Zur quantitativen Messung der Gentranskripte wurde mit dem DyNAmo Flash Sybr Green PCR Kit auf einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Ein einfacher Reaktionsmix mit 20 µl Volumen wurde als Master Mix (ohne die jeweilige cDNA Probe) für alle einzusetzenden Proben vorbereitet und setzt sich, als 20µl Ansatz, folgendermaßen zusammen:

Tabelle 16: Reaktionsmix Sybr Green

Komponenten	Menge	Endkonzentrationen
2x DyNAmo Flash Sybr Green Master Mix	10 µl	1x
Primer forward (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
50x ROX Referenz-Farbstoff	0,06 µl	0,3x
cDNA	1 µl	max. 150 ng
RNase-DNase freies Wasser	8 µl	

Das Reaktions-Protokoll beinhaltet folgende Reaktionsschritte:

Tabelle 17: Reaktionsprotokoll Sybr Green

Schritt	Wirkung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
2	Denaturierung	95 °C	10 s	40
	Annealing+ Elongation	60 °C	30 s	
3	Schmelzkurvenanalyse	60-98 °C	-	1

Nach dem Amplifikationsvorgang wurden die Schwellenwerte (eng. *cycle threshold*; Ct) jedes Testgens innerhalb des exponentiellen Bereichs ermittelt. Die Ct-Werte berechnete sich aus Ct (Haushaltsgen)–Ct (Testgen) der gleichen Probe. Das Verhältnis der Transkripte wurde mit $2^{(\Delta Ct)}$ dargestellt.

$$2^{(Ct(\text{GAPDH RNA})-Ct(\text{zu analysierende mRNA}))}$$

Die Sequenzen der, zur Detektion der humanen und murinen Transkripte, verwendeten Primer *bace1*, *ps1*, *nicastatin*, und *gapdh*, sind in Tab. 10 aufgelistet.

2.2.14.4 qRT-PCR mittels TaqMan Probe

Die Isolation der RNA sowie reverse Transkription wurden wie in Kapitel 2.2.12.1 und 2.2.12.2 beschrieben durchgeführt. Die TaqMan-Proben wurden von Applied Biosystems bezogen. Für die Detektion der Transkripte des *activity-regulated cytoskeleton-associated* Proteins (*arc1*), *TNF-α*, *IL1-β*, *brain-derived neurotrophic factor* (*bdnf*), *C-C chemokine ligand* (*ccl2*), *nitric oxide synthase* (*nso2*) und *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme* (*bace*) (alle Maus) wurde das DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit verwendet. Als Haushaltsgen wurde *glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase* (*gapdh*) genutzt. Ein Reaktionsmix mit 20 µl Volumen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 18: Reaktionsmix TaqMan

Komponenten	Menge	Endkonzentrationen
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix (inkl. Referenz-Farbstoff Rox)	10 µl	1x
PrimerMix inklusive Probe	1 µl	500 nM Primer, 250 nM TaqManProbe
cDNA	1 µl	max. 150 ng
RNAse-DNAse freies Wasser	8 µl	-

Das Reaktions-Protokoll beinhaltete folgende Reaktionsschritte:

Tabelle 19: Reaktionsprotokoll TaqMan

Schritt	Wirkung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	95 °C	7 min	1
2	Denaturierung	95 °C	3 s	40
	Annealing + Elongation	60 °C	30 s	

Nach dem Amplifikationsvorgang wurden die Ct-Werte jedes Testgens innerhalb des exponentiellen Bereichs ermittelt. ΔCt -Werte berechnete sich aus Ct (*gapdh*) – Ct (Testgen) der gleichen Probe. Das Verhältnis der Transkripte wurde mit $2(\Delta\text{Ct})$ dargestellt.

2.2.15 Immunzytochemie

2.2.15.1 Behandlung der LC3-GFP-RFP Zellen mit p38-MAPK Inhibitor

Um den Effekt von p38 α -MAPK auf die Autophagie zu untersuchen, wurden LC3-GFP-RFP-transgene Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Wellplatte in DMEM + 10 % FCS + 500 $\mu\text{g/ml}$ G418 kultiviert. Diese Zellen fluoreszieren bei Anregung entsprechender Wellenlänge rot bzw. grün. Je 1×10^5 der LC3-GFP-RFP-transgene Zellen wurden mit dem p38-MAPK Inhibitor SB203580 in einer Konzentration von 0, 10 und 30 μM über 2 h behandelt. Danach wurden die Zellen für 5 min mit 4 % PFA fixiert und mit Antifade Medium eingedeckt. Die Zellen wurden unter einem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) begutachtet. Mehr als 40 zufällig ausgewählte Bereiche wurden pro Inhibitorkonzentration mit einem Objektiv in 40 x Vergrößerung (*pin hole* 1 AU) aufgenommen und über 300 Zellen ausgezählt. Die gesamte Zellzahl wurde pro Bildausschnitt ausgezählt und die Zellen mit roter oder grüner Fluoreszenz wurden ebenfalls ermittelt. Um die Autophagierate zu ermitteln, wurden die rot bzw. grün fluoreszierenden Zellen durch die Gesamtzellzahl dividiert. Dieses Experiment wurde in unabhängigen Versuchen dreimal wiederholt.

2.2.15.2 BACE und Autophagievakuolen

LC3A/B ist die für eine funktionierende Autophagiemaschinerie von großer Bedeutung. Daher wurden, um das Verhältnis von BACE und Autophagievakuolen zu untersuchen, SHSY5Y Zellen in 8 *well chamber sides* in einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Well kultiviert. Die Zellen wurden mit oder ohne Bafilomycin für 6 h behandelt. Bafilomycin gilt als Autophagieinhibitor und blockiert die Fusion

von Autophagosomen mit Lysosomen. Dadurch soll BACE, falls es per Autophagie degradiert wird, in den Vakuolen akkumulieren und so zusammen mit LC3A/B detektierbar sein. Nach Fixierung der Zellen in Methanol bei -20 °C wurden die Zellen in PBS + 0,3 % Triton inkubiert, um die Permeabilität der Antikörper zu erhöhen. Danach wurden die unspezifischen Bindungen mit 5 % FCS für 1 h bei RT geblockt. Zunächst wurden die Zellen mit dem BACE Antikörper aus der Maus (R&D Systems) über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend nach dreimaligem Waschen mit TBST je 10 min für 1 h bei RT an den Sekundärantikörper Alexa488 gekoppelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST je 10 min, wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen LC3A/B für 1 h bei RT gefärbt und durch einstündige Inkubation bei RT an den Cy3-konjugierten Sekundärantikörper gekoppelt. Ob BACE in autophagischen Vakuolen lokalisiert ist, wurde mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Die immunzytochemische Färbung von BACE und Cathepsin D, einem Markerprotein des lysosomalen Degradationswegs, wurde wie oben geschildert durchgeführt. Der Primärantikörper BACE (CST) wurde 1:100 in dem Verdünnungspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert und mittels des Sekundärantikörpers Cy3 sichtbar gemacht. Cathepsin D wurde ebenfalls 1:100 eingesetzt und nach Inkubation für 1 h bei RT an den Fluoreszantkörper Alexa488 gekoppelt. Alle konfokalen Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) und einem Objektiv in 40 x Vergrößerung (*pin hole* 1 AU) mit 1x Zoom aufgenommen.

2.2.16 Primärkultur von embryonalen Neuronen

Um die *in vitro* Resultate der ATG5 wt bzw. DN Zellen zu verifizieren wurden aus Embryonen des Stammes ATG5^(lox/lox) die Neurone freipräpariert und *ex vivo* in Kultur genommen. Dazu wurde das Muttertier durch Überstreckung des Genicks getötet und die Embryonen unter semi-sterilen Bedingungen aus dem Embryosack präpariert und dekapitiert. Der Schädel wurde in HBSS + 1 % Penicilin/Streptomycin auf Eis platziert. Nun wurde das Großhirn isoliert und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml HBSS + 1 % Penicilin/Streptomycin überführt. Die Hirnzellen wurden mittels 1 ml Trypsin pro Reaktionsgefäß für 15 min bei 37 °C enzymatisch aus dem Gewebeverband gelöst. Unter sterilen Bedingungen wur-

den die Zellen fünfmal mit HBSS + 1 % Penicilin/Streptomycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer sterilen Glaspipette, durch 20 maliges Aspirieren, und mit einer Glaspipette mit verengtem Durchmesser, durch 5 maliges Aspirieren vereinzelt. Danach wurden die Zellen in Neurobasalmedium (+ 2 % B27 + 0,25 % LGlutamin + 0,1 % Glutamax) in 6 cm Polystyrolzellkulturschalen⁺ mit 20 µg /ml Poly-L-Lysin Beschichtung in Kultur genommen. Nach 4 d wurde das Neurobasalmedium durch Neurobasalmedium mit 800 nM Tamoxifen (in Ethanol) ersetzt. Tamoxifen ist bei diesem Prinzip der spezifische Ligand des Hitzeschockproteins, welches CreERT im Zytosol bindet, und ermöglicht so die Rekombination des ATG5^{lox} flankierten Gens durch CreERT. Insgesamt dauerte die Behandlung mit Tamoxifen 10 d, wobei das Medium nach 2 d frisch angesetzt und ausgetauscht wurde. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 1 ml PBS mit Protease Inhibitor Cocktail mit einem Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die Zellen bei 1200 rpm für 8 min bei 4 °C Pelletiert und das Zellpellet je nach Größe in 200-500 µl RIPA Puffer mit Proteaseinhibitorcocktail wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben mit einer 24 und 27-G Kanüle homogenisiert und die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Kapitel 2.2.7 durchgeführt.

2.3 Analysen in vivo

2.3.1 Wasserlabyrinth nach Morris

Defizite im Bereich des räumlichen Lernens sollen in den verschiedenen transgenen Mausmodellen (APP/PS1^{tg}-p38-Nex-Cre und Tau^{tg}-p38-Nex-Cre) bzw. alternden wt-Geschwistertieren mittels Untersuchungen im Wasserlabyrinth erfasst werden. Die versteckte Plattform (Durchmesser 11 cm) befindet sich als Zuflucht 1 cm unter der Wasseroberfläche des befüllten Wasserbassins (Durchmesser 134,5 cm, Tiefe 83 cm). Das ca. 20 °C warme Wasser wird mit ungiftiger weißer Farbe opak gemacht und verhindert somit das visuelle Erkennen der Plattform durch die Versuchstiere. Die Position der Plattform bleibt unverändert für die Dauer der Testserie. Drei voneinander unterschiedliche Einlasspunkte werden gewählt, an denen die Tiere mit dem Gesicht zur Beckenwand in das Wasser gelassen werden. Die Einlasspunkte selbst und die Reihenfolge werden über die Versuchsdauer beibehalten. Der Test wird an 7 auf-

einanderfolgenden Tagen, mit drei Einlasspunkten pro Maus und pro Tag durchgeführt. An dem ersten Trainingstag beträgt der erste, zweite sowie der dritte Versuch, max. 10 min. An den folgenden Tagen beträgt jeder Versuch nur noch max. 5 min. Nach Erreichen der Plattform wird die Maus 10 s auf der Plattform belassen und dann zum Trocknen und Regenerieren in ihrem Käfig unter die Rotlichtlampe gesetzt. Die Zeit, die Wegstrecke und die Geschwindigkeit, die die Maus bis zum Erreichen der Fluchtplattform benötigt, werden mit einer automatischen Videoanlage, dem EthoVision XT Trackingsystem (Version 7.0), welches an der Decke des Raums angebracht wurde (Noldus) aufgezeichnet und ausgewertet. Nach Beendigungen der ersten 7 Testtage folgt ein Ruhetag. Am darauffolgenden Tag wird ein finaler Test durchgeführt, bei dem die Plattform unerreichbar bis auf den Boden des Wasserbassins abgesenkt wird. Nun wird die Zeit, die die Maus an dem Ort verbringt an dem sich zuvor die Plattform befunden hatte, als Maß für die Retention des Gelernten gemessen. Des Weiteren wird die Latenzzeit und die zurückgelegte Distanz bis zum Erreichen der Plattform als Zufluchtsort während des Tests aufgezeichnet. Der erste Testtag wurde als Training betrachtet und floss nicht in die statistische Analyse ein.

2.3.2 Sektion der Versuchstiere und Probengewinnung

Zur Gewinnung von Hirngewebe für IHC, PCR, Enzym-Aktivitätsmessungen und *Western blot* wurden die Mäuse im Alter von 4 Wochen und 4 bzw. 9 Monaten durch eine Überdosierung einer Gasnarkose (Isofluran) getötet. Vor Entnahme des Hirngewebes, wurde eine transkardiale Perfusion mit 20 ml PBS durchgeführt. Das isolierte Hirn wurde midsagittal halbiert. Für IHC wurden die linken Hemisphären in 4 % PFA für 2 Tage bei 4 °C fixiert. Für biochemische Untersuchungen wurden die rechten Hemisphären weiter aufgeteilt. Der Bulbus olfactorius sowie das Cerebellum wurden verworfen. Eine 0,5 µm dicke Scheibe der rechten Hemisphäre wurde sagittal abgetrennt und für qRT-PCR-Analysen in 1 ml Trizol bei -80 °C gelagert. Die verbleibende rechte Hemisphäre wurde coronal halbiert und für *Western blot* bzw. Enzym-Aktivitätsmessungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 IHC

Für alle immunhistochemischen Analysen sagittaler Hirnschnitte, wurden die linken Hemisphären nach Postfixation für 48 h in 4 % PFA bei 4 °C in Paraffin eingebettet. Dazu wurde das Hirn in Einbettkassetten einsortiert und mittels der Einbettmaschine über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (Reihenfolge: Ethanol 50 % für 10 min, Ethanol 70 %, Ethanol 80 % und viermal Ethanol 100 % für je 1:05 h, zweimal Xylol für je 0:55 h, und einmal Xylol für 1:20 h) und anschließend in heißem Paraffin bis zur manuellen Einbettung inkubiert (mindestens zweimal Paraffin für je 1:50 h). Die Proben wurden in Metallkassetten orientiert, mit Paraffin überschichtet und auf einer Kühlplatte bis zur vollständigen Aushärtung bei 0 °C gekühlt. Von diesen Gewebelöcken wurde anschließend mit einem Schlittenmikrotom serielle 50 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden bei 85 °C im Wasserbad gestreckt und auf silanisierte Objektträger (2 % Silan in Aceton) aufgezogen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 60 °C im Heizofen inkubiert, um das überschüssige Paraffin abzuschmelzen und um die Schnitte an die Objektträger zu binden. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurde die endgültige Deparaffinisierung über Xylol und die Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (Reihenfolge: 2x 5 min Xylol, 2x 3 min 100 % Ethanol, 3 min 96 % Ethanol, 3 min 70 % Ethanol, 3 min 50 % Ethanol, dH₂O) durchgeführt. Falls nicht anders vermerkt wurde danach eine Demaskierung der Epitope durch Mikrowellen-induzierte Hitzebehandlung (4x 5 min bei 600 Watt) durchgeführt und die Schnitte für 20 min auf RT abgekühlt, um anschließend in PBST bzw. TBST gewaschen zu werden. Anschließend erfolgte die immunologische Färbung der entsprechenden Proteine, wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

2.3.3.1 Immunhistochemische Färbung von p38-MAPK

Um die Nex-Cre eingeleitete neuronale Deletion von p38α-MAPK zu demonstrieren, wurde das in 4 % PFA fixierte Maushirn für 2 d in 30 % Sucrose bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Hirn in Tissue-Tek® O.C.T. Compound eingebettet. Dazu wurde das Gewebe in dem Eindeckmedium mit dem Gefrieremittler 2-Methylbutan in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden mit einem Cryomikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt und auf silanisier-

te Objektträger (2 % Silan in Aceton) aufgezogen. Danach wurden die Schnitte über Nacht getrocknet, in eisgekühltem Aceton für 10 min bei -20 °C fixiert, abermals getrocknet und über eine absteigende Alkoholreihe für die Färbung rehydriert (Reihenfolge: 100 % Ethanol 3 min, 96 % Ethanol 3 min, 70 % Ethanol 3 min, 50 % Ethanol 3 min, 50 % Ethanol 3 min, dH₂O 3 min). Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen in 5% Ziegenerum + 0,2 % Triton-X-100 in 1x TBS für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer abgeblockt. Für immunfluoreszente Färbung wurde der, aus dem Kaninchen stammende, polyklonale Primärantikörper gegen p38-MAPK über Nacht 1:100 in 1 % Ziegenerum + 0,2 % Triton-X-100 in 1x TBS verdünnt und bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBS bzw. TBST, wurde der Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Kaninchen IgG, gekoppelt an Alexa488, 1:500 in 1 % Ziegenerum + 0,2 % Triton-X-100 in 1x TBS verdünnt und für 2 h bei RT in der dunklen Feuchtkammer inkubiert. Die Neurone wurden nach dreimaligem Waschen mit dem monoklonalen Primärantikörper aus der Maus gegen NeuN in einer Verdünnung von 1:100 in 1 % Ziegenerum + 0,2 % Triton-X-100 in 1x TBS über Nacht bei 4 °C in einer dunklen Feuchtkammer markiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 10 min in TBS bzw. TBST (20 min TBS, 10 min TBST), wurde NeuN mit dem Sekundärantikörper aus der Ziege gegen Maus IgG, gekoppelt an Cy3, visualisiert.

2.3.3.2 Immunhistochemische Färbung von A β

Die Schnitte wurden wie in 2.3.4 beschrieben deparaffinisiert und rehydriert. Das Demaskieren der Antigenepitope erfolgte mit 2 mM HCl unter Hitzebehandlung (4x5 min bei 600 Watt). Als weiterer Schritt der Antigendemaskierung wurden die Schnitte 1 min in 100 % Ameisensäure getaucht, bevor sie 2x 5 min in TBS und 5 min in TBST für die weitere immunhistologische Detektion äquilibriert wurden. Die A β Plaques der Gehirnschnitte der 4 Monate alten Mäuse wurden über eine Fluoreszenzfärbung visualisiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Schnitte in PBST + 0,2 % Casein (w/v) für 1 h bei RT abgesättigt. Der Primärantikörper Maus monoklonal anti human Amyloid β (Klon 6C3) wurde 1:100 in PBS + 0,02% Casein (w/v) verdünnt und gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Die Inkubation des Primäranti-

körpers fand in einer feuchten Kammer bei 4 °C statt und die Inkubationsdauer betrug 16 h. Die Schnitte wurden wieder gewaschen und die Färbung durch Inkubation der Schnitte mit Cy3-conjugated Ziege anti-Maus IgG visualisiert und in *Prolong Mounting Medium* eingedeckt.

Die A β Plaques der Gehirnschnitte der 9 Monate alten Mäuse wurden über eine Enzym-Substrat-Reaktion für die Durchlichtmikroskopie visualisiert. Zur Absättigung gewebeeigener Peroxidasen, wurden die Schnitte in d_4H_2O + 3 % H_2O_2 + 17 % Methanol für 30 min inkubiert und anschließend 2x 5 min in TBS und 5 min in TBST gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer transferiert und mit PBST + 0,2 % Casein (w/v) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS und TBST, wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper Maus monoklonal anti humanes A β , wie für die 4 Monate alten Tiere beschrieben, durchgeführt. Die Schnitte wurden wieder gewaschen und mit dem Sekundärantikörper Ziege anti Maus HRP 1:100 in PBS + 0,02 % Casein (w/v) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschgängen 2x 5 min in TBS und 5 min in TBST wurden die Schnitte mit 1 mg/ml Diaminobenzidin (DAB)-Hydrochlorid (50 mg DAB-Hydrochlorid in 50 ml TBS + 17 μ l 30 % H_2O_2) für 3 min bei RT entwickelt. Für die Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Präparate für 10 s in gefilterter Mayer's Hämalaunlösung getaucht und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Als letzter Arbeitsschritt durchliefen die Schnitte zur Entwässerung eine aufsteigende Alkoholreihe (Reihenfolge: d_4H_2O , 3 min 50 % Ethanol, 3 min 70 % Ethanol, 3 min 96 % Ethanol, 2x 3 min 100 % Ethanol, 2x 5 min Xylol), bevor sie jeweils mit 2 Tropfen des Einschlussmittels Entellan eingedeckt wurden. Alle Bilder wurden mit dem Zeiss Axiolmager.Z2 Mikroskop, ausgestattet mit dem Stereo Investigator System (MBF Bioscience, Williston), aufgenommen. Im kompletten Hippocampus und Cortex, wurde das Volumen der A β -Plaques und das ausgewertete Hirnvolumen mittels der Cavalieri Methode geschätzt. Dazu wurde das auszuwertende Hirnareal umrandet und über dieses Interessengebiet ein Gitter, mit Abstand von 15 μ m für den Hippocampus und 20 μ m für den Cortex, gelegt. Bei dieser Gittergröße wurde ein Fehlerkoeffizient von <0.05 ermittelt. Alle Plaques, die diese Gitterpunkte berühren, wurden gezählt und letztendlich mit der Software das ungefähre Plaquevolumen, relativ zu der um-

randeten Gebietsfläche, geschätzt. Der A β -Gehalt wurde also aus dem Verhältnis von A β -Volumen zu dem relevanten Hirnvolumen dargestellt.

2.3.3.3 Immunhistochemische Färbung der Mikroglia

Die Mikroglia der Gehirnschnitte von 9 Monate alten Mäuse wurden mit dem Antikörper gegen das ionisierte Kalzium-bindende Adaptermolekül 1 (eng. *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Iba1) markiert. Dazu wurden die Schnitte wie in 2.3.4 beschrieben deparaffinisiert und rehydriert. Das Demaskieren der Antigenepitope erfolgte in 1x Zitratpuffer unter Hitzebehandlung (4x5 min bei 600 Watt). Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Schnitte in PBST + 0,2 % Casein (w/v) für 1 h bei RT gesättigt. Der Primärantikörper Iba1 wurde 1:500 in PBS + 0,02 % Casein (w/v) verdünnt und gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4 °C für 16 h. Die Schnitte wurden dreimal in TBST gewaschen und die Iba1 positiven Mikroglia wurden durch Inkubation mit Alexa488-konjugiertem Sekundärantikörper visualisiert und in *Prolong Mounting* Medium eingedeckt. Alle Bilder wurden mit dem Zeiss AxioImagerZ2 Mikroskop, ausgestattet mit dem Stereo Investigator System (MBF Bioscience, Williston), aufgenommen. Im kompletten Hippocampus und Cortex, wurde die Anzahl der Iba1 positiven Mikroglia in Bezug auf das Hirnareal mittels der *Optical Fractionator* Methode (MicroBrightField) wie bereits publiziert (Liu et al., 2014) analysiert. Dazu wurde das auszuwertende Hirnareal von drei Schnitten pro Tier in einem Intervall von 500 μ m umrandet und über dieses Interessengebiet ein Zählmaske mit 120 x 120 x 18 μ m als Parameter für den Dissektor und 400 x 400 μ m für das Probengitter gelegt. Iba1 positive Zellen mit DAPI als Zellkernfärbung wurden ausgezählt. Der geschätzte Fehlerkoeffizient betrug dabei <0.05.

2.3.3.4 Apoptose Nachweis mittels TUNEL-Färbung

Um Nebeneffekte nach einer p38 α -MAPK Deletion in APP/PS1^{tg} Mäusen auszuschließen, wurden Paraffinschnitte dieser Tiere angefertigt und nach Kapitel 2.3.3 vorbereitet. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte nach Anwendung des *In situ cell death detection kits Ap*. Während der Apoptose wird die DNA

durch Endonuklease defragmentiert und es entstehen kurze DNA Fragmente. Diese Doppelstrangbrüche können durch Färbung der freien 3'-OH Enden über enzymatische Farbreaktionen angefärbt werden. Bei der TUNEL Technik (eng. *terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) werden die 3'-OH-Gruppen durch das Enzym TdT mit dem Fluorophor Fluorescein gekoppelt und die apoptotische Zellen werden sichtbar. Nach der Hitzebehandlung wurde die Enzymlösung nach Herstellerangaben 1:10 in der Färbelösung angesetzt und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 37°C auf den Schnitten inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Schnitte die zuvor mit 1 U DNase I (Promega, 1 U/μl) in 1x DNasepuffer für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen wurden. Für die Negativkontrollen wurde lediglich die Färbelösung ohne Enzymlösung auf den Schnitten für 1 h bei 37 °C inkubiert. Um die Lokalisation apoptotischer Zellen zu bestimmen, wurde anschließend eine Antikörperfärbung mit NeuN über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen, je 10 min in PBST, wurde NeuN mittels Inkubation des, aus der Maus gewonnen IgG gekoppelten-Cy3, Sekundärantikörpers für 2 h bei RT angefärbt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBST, wurden die Schnitte in antifade mounting Medium eingedeckt und mit dem Zeiss AxioImagerZ2 Mikroskop, ausgestattet mit dem Stereo Investigator System, begutachtet. Zur Auswertung wurden alle TUNEL positiven Zellen im Cortex und Hippocampus ausgezählt. Des Weiteren wurden alle TUNEL und NeuN positiven Zellen in beiden Hirnarealen beider Genotypen ausgezählt und beide Zellzahlen durch das jeweilige Hirnvolumen angepasst.

2.3.4 Isolation der Membranfraktion und Sekretasen-Aktivitätsmessung

Das Hirngewebe wurde in 1 ml Sucrosepuffer gemäß Kapitel 2.2.5 resuspendiert und verarbeitet. Schließlich wurde das Pellet in 500 μl β-Sekretase Assay Puffer, unter Verwendung von 27-G Kanülen, bzw. in γ-Sekretase Assay Puffer resuspendiert. Um die β- und γ-Sekretasen-Aktivität im Maushirn zu vermessen, wurden die Proben gemäß Kapitel 2.2.5 und 2.2.7 vorbereitet und eingesetzt.

2.3.5 Präparation von Hirnhomogenaten

Das Maushirnhomogenat wurde nach einem etablierten Protokoll hergestellt (Maier et al., 2008). Die gefrorene Großhirnhemisphäre wurde gewogen, das

Gewebe in RIPA Puffer mit Proteaseinhibitorcocktail (500 µl/100 mg Gewebe), über 10-maliges Aspirieren einer 24 und 27-G Kanüle, homogenisiert und bei 16.100 xg, 30 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration sämtlicher Proben wurde mittels Bradford-Messung bestimmt.

2.3.6 Präparation der Tau Fraktionen

Um das aggregierte pTau in den Taut⁹ p38α-MAPK wt und ko Tieren zu isolieren, wurde das Hirngewebe gewogen und in 500 mg/ml *reassembly* (RAB) *High-Salt* Puffer wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, homogenisiert. Danach wurde das Homogenat, wie in Yoshiyama *et al.* beschrieben bei 50 000 xg für 40 min bei 4°C zentrifugiert (Yoshiyama et al., 2007). Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis und ein Zentrifugationsschritt bei 10 000 xg für 10 min bei 4 °C. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand auf ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die RAB lösliche Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Messung bestimmt. Das Pellet wurde in 600 µl 1 M Sucrose in RAB durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und bei 50 000 xg für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem Myelin wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 1 g/ml RIPA Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und bei 50 000 xg für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration in der RIPA Fraktion daraus über Bradford-Messung ermittelt. Das Pellet wurde in 1 g/ml 70 % Ameisensäure (eng. *formic acid*; FA) für 10 s bei 2 Zyklen und einer Power von 40 % auf Eis mit dem Sonifikator homogenisiert und mit Neutralisationspuffer (1 M Tris, 0,5 M NaH₂PO₄), der mit 10 M NaOH auf einen pH Wert von 7,0 eingestellt wurde, in einem Verhältnis von 1:20 neutralisiert. Anschließend wurde die FA Fraktion erneut sonifiziert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt.

2.3.7 Immunologischer Nachweis von Tau

Die Proteinlysate wurden nach Kapitel 2.3.6 aus Maushirn gewonnen, und die Proteinkonzentration nach Kapitel 2.2.7 gemessen. Die SDS-PAGE und der Proteintransfer wurden, wie in Kapitel 2.2.9-2.2.10 beschrieben, durchgeführt.

2.3.8 Immunologischer Nachweis von A β

Um A β , C99 und APP im Maushirn nachzuweisen, wurde das Hirngewebe von APP/PS1^{tg} p38 α wt und ko Tieren in 5 ml RIPA Puffer mit Proteaseinhibitorcocktail pro 1 g Gewebe auf Eis homogenisiert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten nach Kapitel 2.2.11. Für jede Probe wurde das Proteinlevel als Verhältnis von Zielprotein und APP als interne Kontrolle, sowie das Verhältnis von Zielprotein und β -Actin als interner Ladekontrolle berechnet.

2.4 Statistik

Die in den Abb. gezeigten Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Zum Vergleich zweier Testgruppen wurde der Zweistichproben-t-Test verwendet. Zum Vergleich mehrerer Testgruppen wurde die ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) gefolgt von der Bonferro-*ni*- oder Tukey-Korrektur herangezogen. Statistische Analysen einschließlich der Korrelation nach Pearson, wurden mit der Statistik-Software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, Chicago*) Version 16.0 durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde auf $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***) gesetzt. Zum Beispiel ist ein 2-way ANOVA notwendig, um das Lernverhalten im Morris *water maze* zu analysieren.

3 Ergebnisse

3.1 Deletion der neuronalen p38 α -MAPK in APP/PS1^{tg} Mäusen

In postmortalem Gewebe von AD-Patienten ist eine erhöhte Expression von p38-MAPK nachgewiesen (Hensley et al., 1999a; Sun et al., 2003b). Um dies in dem verwendeten APP/PS1^{tg}-Mausmodell zu bestätigen, wurde die Aktivität von p38-MAPK in Form von phosphoryliertem p38 (p-p38) im Hirnhomogenat mittels quantitativem *Western blot* analysiert. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus von p38-MAPK in 4 Monate alten APP/PS1^{tg} Mäusen und ihren Wildtypgeschwistern verglichen. Die APP/PS1^{tg} Mäuse weisen, nach Normalisierung gegen p38-MAPK als interne Kontrolle, ein signifikant gesteigertes Level an p-p38 auf (Abb.9 A; t-Test; $p < 0,05$; $n \geq 4$ pro Gruppe). Um zu ergründen welche Funktion die p38-MAPK in den APP/PS1^{tg} Mäusen und somit in der AD-Pathogenese einnimmt, wurde mittels der Nex-Cre-Technik p38 α -MAPK heterozygot in den Neuronen APP/PS1^{tg} Mäuse deletiert. Die Hirnhomogenate von einem Monat alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK heterozygoten ko und wt Geschwistertieren wurden mittels *Western blot*, unter Verwendung des gegen p38 gerichteten Antikörpers, durch Ermittlung des Proteinlevels von p38-MAPK und Normalisierung über α -Tubulin analysiert. Die APP/PS1^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(Cre/wt) (p38 α heterozygot) ko Tiere zeigen eine signifikante Reduktion von p38 um ca. 70 % im Vergleich zu Ihren gleichaltrigen APP^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(wt/wt) (p38 α wt) Geschwistern (Abb.9 B; t-Test; $p < 0.05$; $n = 7$ pro Gruppe). Da bei einem heterozygoten ko lediglich ein Allel deletiert wird und da der verwendete p38-MAPK Antikörper alle p38-MAPK Untereinheiten erkennt, war mit einem gewissen verbleibenden Proteinlevel an p38-MAPK zu rechnen. Zudem wird p38-MAPK von Zellen, die nicht unter der Regulation des nex Genes stehen, weiterhin exprimiert. Mit 2 μ m dicken, sagittalen Cryoschnitten wurde eine Doppelfärbung gegen p38-MAPK und NeuN, einem Marker für Neuronen, in dem Hirn von 4 Monate alten p38^(lox/lox)-Cre^(Cre/wt) (p38 α homozygote ko Tieren) und p38^(lox/lox)-Cre^(wt/wt) (p38 α wt) Geschwistertieren durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit dem Antikörper gegen p38, gekoppelt an das Fluorophor Alexa488, und mit dem Antikörper gegen NeuN, gekoppelt an das Fluorophor Cy3 gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Eindeckmedium, welches den blauen Fluo-

reszenzfarbstoff DAPI beinhaltet und dadurch die Zellkerne aller zerebralen Zelltypen anfärbt, eingedeckt. Im Cortex von p38 α -MAPK wt Mäusen weist die p38-Färbung ein punktuierendes Färbemuster um die NeuN-positiven, neuronalen Zellkerne auf. Im Gegensatz dazu, konnte keine Neurone mit positiver p38-MAPK Färbung in den p38 α ko Mäusen detektiert werden (Abb.9 C). Im Hippocampus zeigen beide Genotypen eine schwache Färbung von p38 in Neuronen.

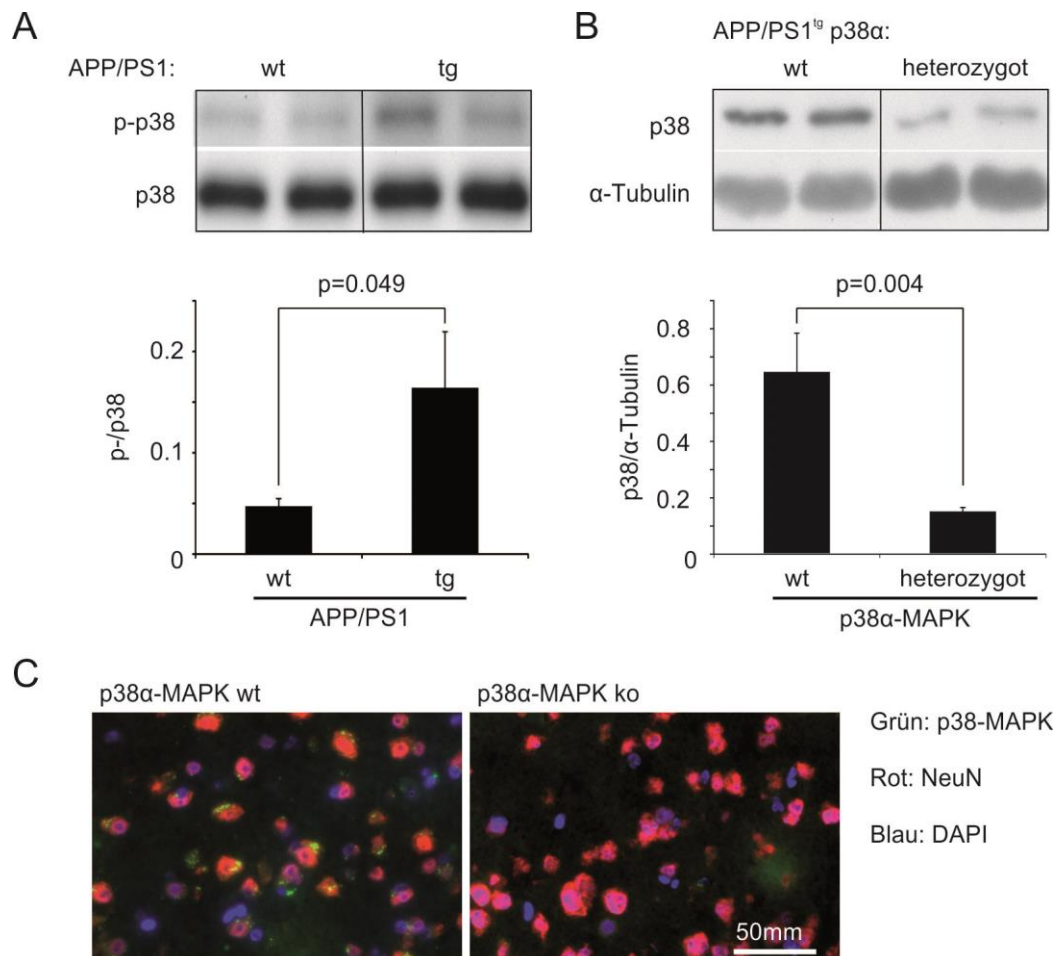


Abbildung 9: Deletion der neuronalen p38 α -MAPK Das Hirnhomogenat von 4 Monate alten APP/PS1^{tg} Mäusen und Wildtypgeschwistern wurde auf das Phosphorylierungs-Level von p38 hin mittels *Western blot* untersucht (A; *t*-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). Ebenfalls wurde das Hirnhomogenat von einem Monate alten p38 α -MAPK wt und heterozygoten ko Tieren mittels *Western blot* bezüglich des Gesamtlevels von p38 untersucht (B, *t*-Test; $n=7$ pro Gruppe). A und B gruppieren repräsentative Banden unterschiedlicher Bereiche eines Gels. C: Hirnschnitte von 4 Monate alten p38 $\alpha^{(lox/lox)}$ -Cre^{+/+} (p38 α -MAPK ko) und p38 $\alpha^{(lox/lox)}$ oder p38 $\alpha^{(lox/wt)}$ -Cre^(Cre/wt) (p38 α -MAPK wt) Geschwistertieren wurden mit NeuN (rot) und p38 (grün) angefärbt und Bilder mit einem 40x Objektiv aufgenommen.

3.2 Deletion von p38 α -MAPK reduziert den zerebralen A β -Gehalt

Sagittale Hirnschnitte von APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK heterozygoten (A: 4 Monate alt) bzw. homozygoten (B: 9 Monate alt) ko Tieren wurden angefertigt. Der zerebrale A β -Gehalt wurde mittels des A β -spezifischen Antikörpers MOAB-2, gekoppelt an Cy3 (A), oder an DAB (B) gefärbt und mit Hilfe der Cavalieri Methode analysiert.

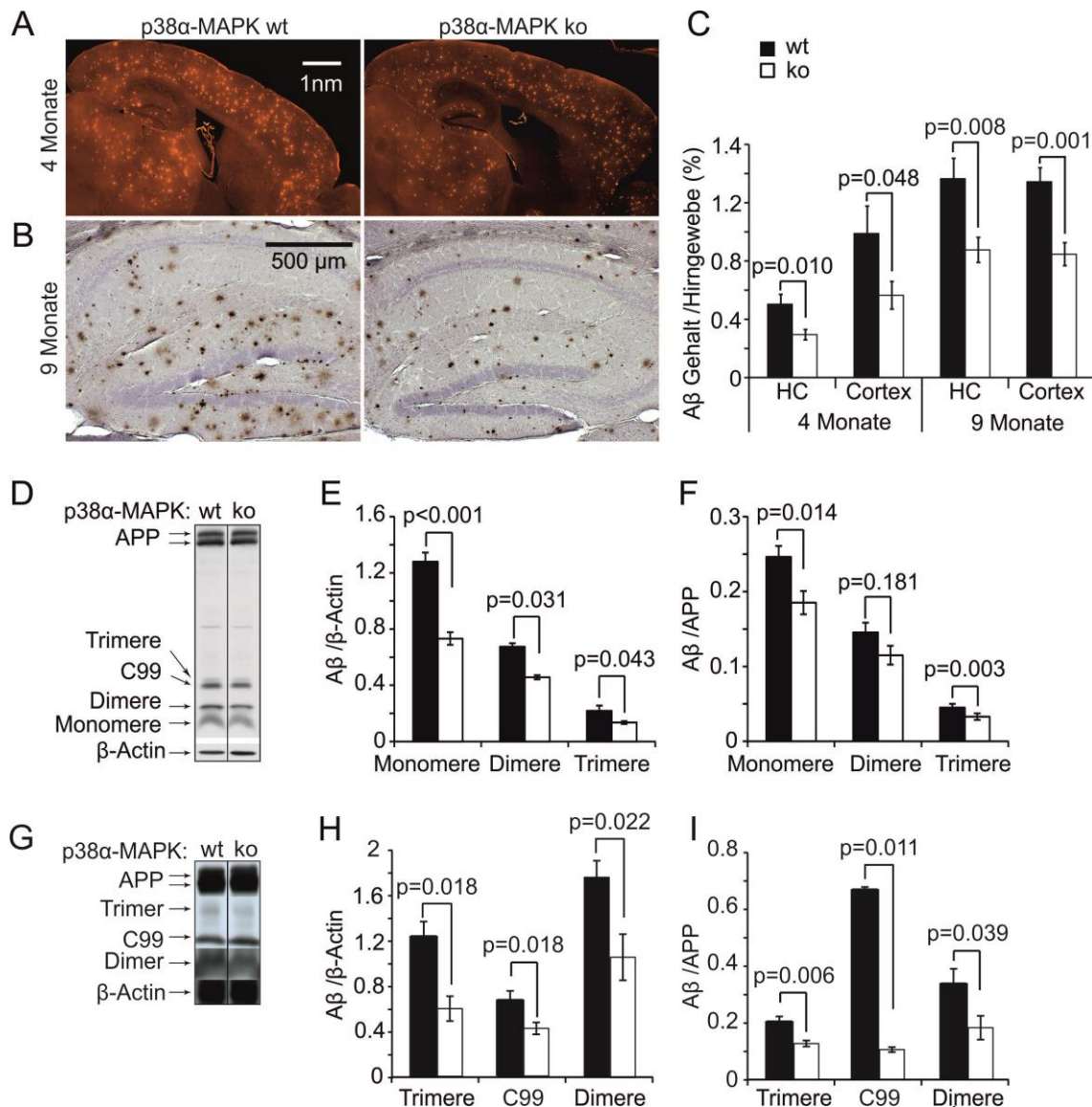


Abbildung 10: p38 α -MAPK ko reduziert den zerebralen A β -Gehalt in APP/PS1^{tg} Mäusen. 4 Monate alte APP/PS1^{tg} p38 α heterozygote und 9 Monate alte APP/PS1^{tg} p38 α homozygote ko und APP/PS1^{tg} p38 α wt Geschwistertiere wurden hinsichtlich ihres zerebralen A β -Gehalts mittels A β -spezifischen humanen Antikörper untersucht (A: 10x Objektiv und Scannen des gesamten Schnittes und B: 5x Objektiv). Das A β -Volumen wurde nach der Cavalieri-Methode mit dem Volumen der entsprechenden Hirnregion normalisiert (C; t-Test; 4 Monate: $n \geq 8$ und 9 Monate: $n \geq 9$ pro Gruppe). Der zerebrale A β -Gehalt dieser Tiere wurde ebenfalls in Hirnhomogenaten mittels quantitativem Western blot ermittelt (D-F; 4 Monate; t-Test; $n \geq 7$ pro Gruppe und G-I; 9 Monate; t-Test; Trimere: $n \geq 3$ und C99 und Dimere: $n \geq 6$ pro Gruppe). D und G gruppieren repräsentative Banden unterschiedlicher Bereiche jeweils eines Gels.

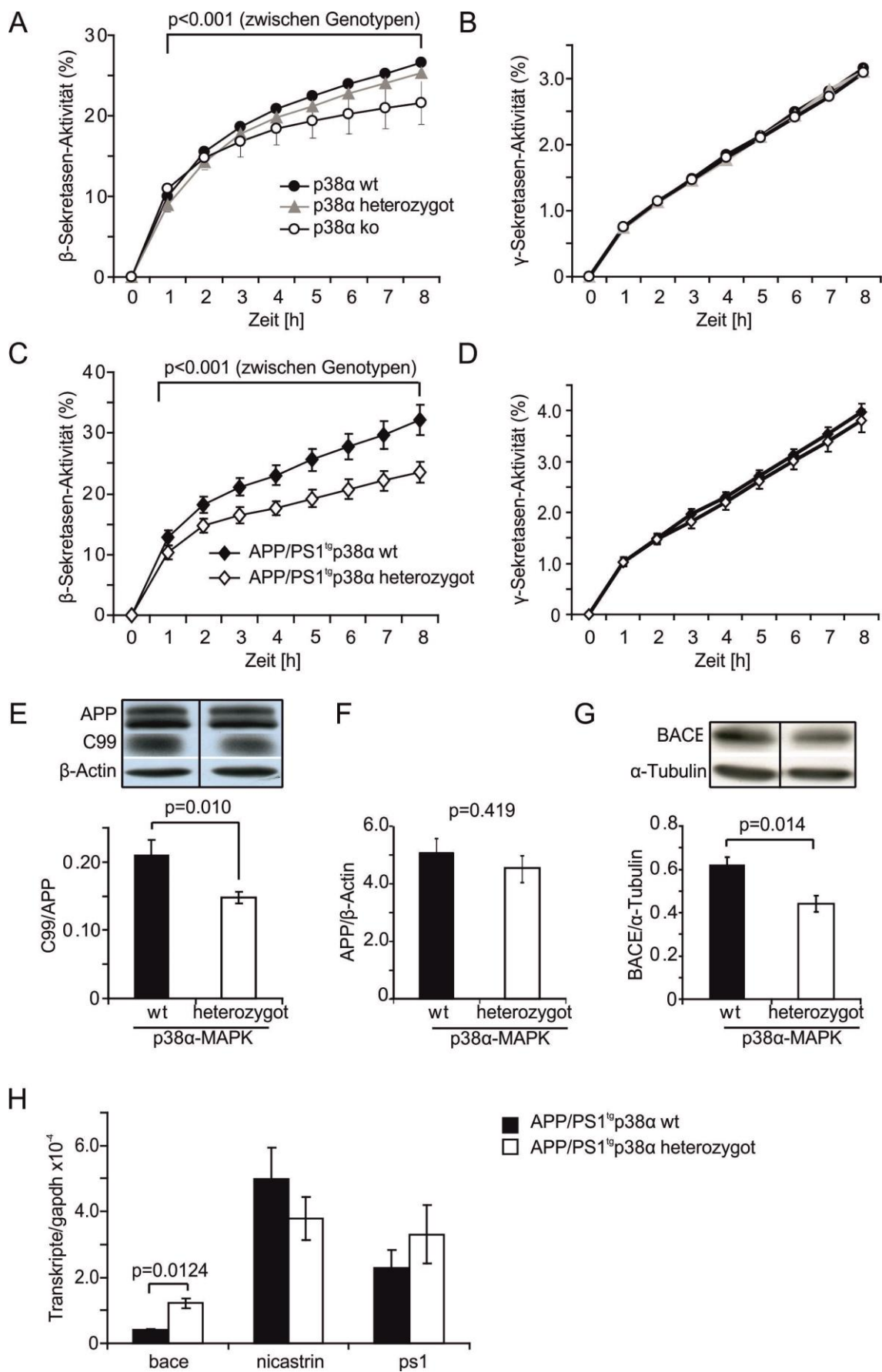
Diese stereologische Auswertung verdeutlicht, dass eine heterozygote Deletion von p38 α in Neuronen den A β -Gehalt im Hippocampus (Δ = 41,6 %) und Cortex (Δ = 42,9 %) bereits in einem Alter von 4 Monaten signifikant reduziert (APP/PS1^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(Cre/wt): Hippocampus: 0.295 ± 0.036 und Cortex: 0.565 ± 0.095 (angepasst durch das zu analysierenden Hirnvolumen) und APP/PS1^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(wt/wt) Geschwistertiere: Hippocampus: 0.504 ± 0.067 und Cortex: 0.989 ± 0.188 ; Abb.10 A und C; t-Test; $p < 0.05$). Eine homozygote Deletion von p38 α -MAPK in Neuronen konnte auch den A β -Gehalt im Hippocampus (Δ = 37,0 %) und Cortex (Δ = 35,8 %) in 9 Monate alten Mäusen signifikant reduzieren (APP/PS1^{tg} p38^(lox/lox)-Cre^(Cre/wt): Hippocampus: 0.876 ± 0.086 und Cortex: 0.847 ± 0.079 (angepasst durch das zu analysierende Hirnvolumen) und APP/PS1^{tg} p38^(lox/lox)-Cre^(wt/wt) Geschwistertiere: Hippocampus: 1.364 ± 0.140 und Cortex: 1.344 ± 0.096 ; Abb.10 B und C; t-Test; $p < 0.05$). Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Hirnhomogenate beider Altersstufen mittels *Western blot* und nach Anwendung eines humanen A β -spezifischen Antikörpers analysiert. In den 4 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Tieren konnte eine Reduktion, nach Normalisierung mittels β -Actin und mittels APP, als interne Ladekontrolle der Monomere, Dimere und Trimere von A β im Vergleich zu den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Tieren nachgewiesen werden (Abb.10 D–F; t-Test; $p < 0.05$). In dem Hirnhomogenat von 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko bzw. wt Tieren konnten neben APP und C99 lediglich die A β -Dimere und Trimere nachgewiesen werden. Diese waren jedoch in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Tieren ebenfalls signifikant reduziert (Abb.10 G–I; t-Test; $p < 0.05$).

3.3 Deletion von p38 α -MAPK reduziert Aktivität und Proteinlevel von BACE

Nachdem eine signifikante Reduktion von zerebralem A β in beiden Altersstufen der p38 α -MAPK heterozygoten (4 Monate) und homozygoten (9 Monate) ko Tieren nachgewiesen werden konnte, wurde nun die Aktivität, das Proteinlevel und die Expressionsstärke der A β prozessierenden β -Sekretase BACE ermittelt. Dazu wurden aus 4 Monate alten nicht-transgenen p38^(lox/lox)-Cre^(Cre/wt) (ko), p38^(lox/wt)-Cre^(Cre/wt) (heterozygot) und p38^(lox/wt) oder p38^(lox/lox)-Cre^(wt/wt) (wt) (Abb.11 A und B) bzw. aus APP/PS1^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(Cre/wt) (heterozygot) und APP/PS1^{tg} p38^(lox/wt)-Cre^(wt/wt) (wt) (Abb.11 C–H) Mäusen die Membrankompo-

nenten isoliert bzw. Hirnhomogenate angefertigt oder Gesamt-RNA isoliert. Die Aktivität der β - und γ -Sekretase wurde durch Inkubation der sekretasenansässigen Membrankomponenten mit fluorogenen β - und γ -Sekretasen Substraten ermittelt (Abb.11 A-D; *two-way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test zwischen unterschiedlichen Genotypen; A und B: $n \geq 4$ pro Gruppe; C und D: $n \geq 10$ pro Gruppe). Die p38 α -MAPK wt Mäuse weisen im Vergleich zu den p38 α -MAPK ko Geschwistern eine deutlich höhere β -Sekretasen-Aktivität auf. Interessanterweise zeigen die p38 α -MAPK heterozygoten ko Geschwistertieren einen intermediären Phänotyp (A). Dies lässt auf eine dosisabhängige Wirkung der p38 α -MAPK Deletion in Bezug auf die β -Sekretasen-Aktivität folgern. Die heterozygote Deletion von p38 α -MAPK führt auch in den APP/PS1^{tg} Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der β -Sekretasen-Aktivität. Dieser Effekt der neuronalen p38 α -MAPK Deletion scheint spezifisch für BACE zu sein, da die Aktivität der γ -Sekretase unverändert bleibt (B und D). Die Proteinlevel von APP, als Substrat der β -Sekretase, C99, als Produkt der β -Sekretase und Substrat der γ -Sekretase, und BACE selbst wurden in den Hirnhomogenaten von 4 Monate alten APP/PS1^{tg} Mäusen mittels quantitativem *Western blot* ermittelt (Abb.11 E-G; $n \geq 4$ pro Gruppe). Die Analysen zeigen eine Reduktion von C99 bei gleicher APP Ausgangsmenge. Neben der verminderten BACE Aktivität weisen die p38 α -MAPK heterozygoten ko Tiere ebenfalls eine Reduktion des Proteinlevels auf. Des Weiteren wurden die Gentranskripte von *bace*, und den zwei Bestandteilen des γ -Sekretasen-Komplexes *nicastrin* und *ps1* mittels qRT-PCR ermittelt. Unerwarteterweise, zeigen diese Ergebnisse eine Hochregulierung der *bace* Transkription nach heterozygoter Deletion von neuronaler p38 α -MAPK um ein Dreifaches (Abb.11 H; t-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). *nicastrin* und *ps1* weisen allerdings keine veränderte Transkriptionsrate auf.

Abbildung 11: Reduzierte BACE-Aktivität und -Proteinmenge nach p38 α -MAPK ko. In den isoliertem Membranfraktionen aus Maushirnen von p38 α wt, heterozygoten und ko Tieren (A und B, $n \geq 4$ pro Gruppe) und APP/PS1^{tg} Tieren (C und D, $n \geq 10$ pro Gruppe) wurde die Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen in Abhängigkeit der Zeit evaluiert (A-D; *two way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test zwischen den Genotypen). Die Mengen von APP, C99 (E-F) sowie von BACE (G) wurden mittels *Western blot* ermittelt (t-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). Außerdem wurde die Transkriptionsrate aus Gesamt-RNA mit Hilfe der qRT-PCR nach Normalisierung mittels *gapdh* ermittelt (H; t-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). E und G, gruppieren jeweils repräsentative Banden unterschiedlicher Bereiche des jeweiligen Gels.



3.4 p38 α -MAPK kd in SHSY5Y Zellen reduziert BACE Aktivität und Proteinmenge

Um die Ergebnisse *in vitro* zu überprüfen, wurde eine Transfektion der Neuroblastomazelllinie SHSY5Y mit artifizieller microRNA (miRNA), kodierend für das p38 α -MAPK Gen, durchgeführt. Zwei unterschiedliche Zielsequenzen für den kd von p38 α -MAPK, nämlich kd509 und kd709 wurden in den Vektor pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR kloniert und für die Transfektion eingesetzt. Die Kontrollzelllinie (kd-ct) wurde mit dem gleichen Vektor und einer nicht-kodierenden miRNA Sequenz transfiziert. Die Aufnahme des Vektors wurde durch mikroskopische Begutachtung der Zellen überprüft, wobei alle positiv transfizierten Zellen das *emerald green fluorescent protein* (EmGFP) exprimieren und dadurch grün fluoreszieren (siehe Abb.32 im Anhang). Zunächst wurde das Proteinlevel von p38 α -MAPK mittels quantitativem *Western blot* untersucht, um den erfolgreichen kd zu verifizieren. Diese Analysen zeigen eine deutliche Reduktion von p38 α -MAPK nach 509kd um 51,4 % und nach kd709 um 44,1 % (Abb.12 A; *one way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $p < 0.001$, $n \geq 15$ pro Gruppe). Die Reduktion von p38 α -MAPK im Zellsystem führt wie in dem AD-Mausmodell zu einer Verminderung des BACE Proteinlevels um ca. 30-40 % (Abb.12 B; *one way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $p < 0.05$ $n \geq 4$ pro Gruppe). Ebenfalls war die β -Sekretasen-Aktivität in den kd509 und den kd709 Zellen im Vergleich zu den kd-ct Zellen jeweils um 25,6 % bzw. 44 % vermindert (Abb.12 C; *two way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test $p < 0,001$; $n \geq 8$ pro Gruppe), wobei die γ -Sekretasen-Aktivität nach wie vor unverändert war (Abb.12 D; *two way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test $p < 0,001$, $n \geq 3$ pro Gruppe). Um den Einfluss des kd von p38 α -MAPK auf Expressionsebene zu überprüfen, wurde die aus den Zellen isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) translatiert und mittels qRT-PCR hinsichtlich der Gene für bace und den γ -Sekretasenkomponenten nicastrin und ps1 analysiert. Das Transkriptionslevel von bace und ps1 war in allen Genotypen unverändert. Allerdings zeigten die kd709 Zellen, im Vergleich zu den kd-ct Zellen, ein um ca. 39 % erhöhtes Expressionslevel an nicastrin auf (Abb.12 E; *one way* ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; $n = 4$ pro Gruppe). Um schließlich den Effekt von p38 α -MAPK auf den A β -Gehalt selbst zu untersuchen, wurden APP^{t9} SHSY5Y Zellen mit dem p38 α -MAPK kd Konstrukten kd-ct, kd509 und kd709 transfiziert.

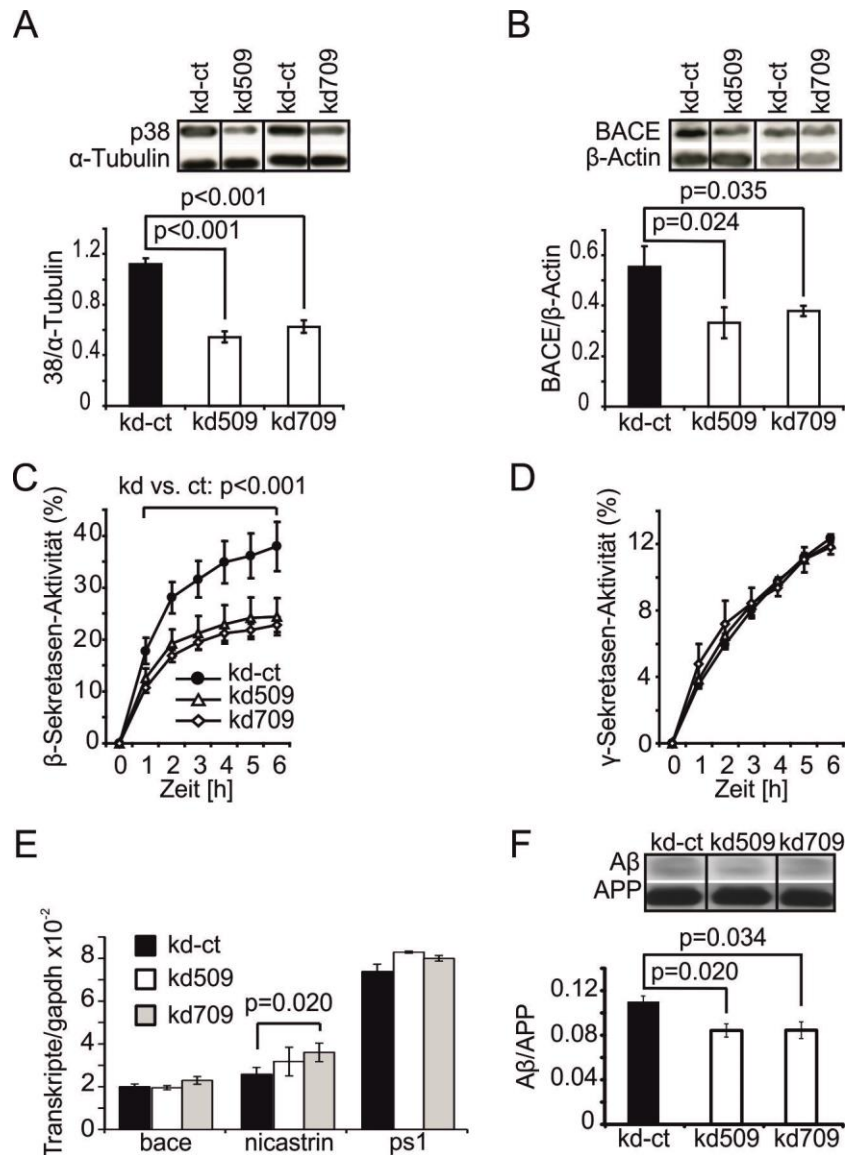


Abbildung 12: kd von p38α-MAPK reduziert Proteinlevel und Aktivität von BACE. SHSY5Y Zellen wurde mit dem Vektor pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR mit den Konstrukten kd509 und kd709 für den kd von p38α-MAPK bzw. einem nicht kodierenden Kontroll-Konstrukt kd-ct transfiziert. Die Proteinlevel von p38α-MAPK und BACE wurden durch quantitativen *Western blot* überprüft und über α-Tubulin bzw. β-Actin normalisiert (A und B; *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; n≥ 4 pro Gruppe). Für die Untersuchung der β- und γ-Sekretasen-Aktivität wurden die Membrankomponenten von kd-ct, kd509 und kd709 isoliert und die Enzym-Aktivität in Abhängigkeit der Zeit evaluiert (C und D; *two way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; n≥ 8 pro Gruppe). Die Transkripte von bace, nicastrin und ps1 wurden mittels qRT-PCR analysiert. (E; *one-way ANOVA* gefolgt von Tukey post hoc Test; n=4 pro Gruppe). APP^{tg} -SHSY5Y wurden mit den Konstrukten für den p38α-MAPK kd transfiziert. Das in das Kulturmedium sezernierte Aβ wurde ebenfalls mittels quantitativem *Western blot* ermittelt und mittels APP normalisiert (F; *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; n≥ 6). A, B, und F: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

Das, in das Kulturmedium sezernierte, Aβ wurde mittels quantitativem *Western blot* nachgewiesen und durch APP normalisiert (Abb.12 F; *one way ANOVA*, gefolgt von Bonferrini post hoc Test; n≥6 pro Gruppe). Die Menge an Aβ war nach kd509 und kd709 um ca. 23 % signifikant vermindert.

3.5 p38 α -MAPK kd beschleunigt Degradation von BACE

Die Reduktion von p38 α -MAPK führt in beiden Modellsystemen, im Maushirn und in den kultivierten Zellen, zu einem verminderten Proteingehalt an BACE, ohne dabei die Expressionsrate des BACE Gens herunter zu regulieren. Um zu überprüfen, ob die BACE Degradation durch p38 α -MAPK kd verstärkt wird, wurde die Halbwertszeit von BACE mittels quantitativem *Western blot* überprüft. Dazu wurde kd-ct, kd509 und kd709 mit Cycloheximid, einem Translationshemmer, behandelt und die Zellen nach 0, 4, 8 und 12 h nach Applikation geerntet. Die Inhibition von p38 α -MAPK erleichtert die Degradation von BACE und reduziert dessen Halbwertszeit signifikant (Abb.13 A und B; *two way ANOVA* gefolgt von Tukey post hoc Test; n=3). Bereits nach 4 h Hemmung der Translation, konnte eine Reduktion des BACE Proteinlevels in den kd709 Zellen um 60 % nachgewiesen werden, wohingegen die kd-ct Zellen erst nach 12 h und die kd509 Zellen nach 8 h die Halbwertszeit von BACE erreicht haben. BACE wird über den lysosomalen Weg degradiert. Dieses Ergebnis wurde durch immunzytochemische Färbungen von SHSY5Y Zellen überprüft und eine Doppelfärbung von der Endoprotease Cathepsin D, welche als lysosomaler Marker gilt, und BACE durchgeführt. Dabei zeigt Cathepsin D, gekoppelt an das Fluorochrom Alexa 488, ein punktuierendes Färbemuster im Zytoplasma und nahe der Zellmembran. BACE, gekoppelt an das Fluorochrom Cy3, zeigt hingegen neben zytoplasmatischer Färbung vor allem entlang der Zellmembran angefärbt ist. Eine Co-Lokalisation von Cathepsin D und BACE findet sowohl nahe der Zellmembran als auch im Zytosol statt (Abb.13 C). Um den BACE Proteingehalt in Lysosomen, nach Inhibition von p38 α -MAPK festzustellen, wurden die Lysosomen von kd-ct, kd509 und kd709 isoliert und über eine Percoll Dichtegradientenzentrifugation in 4 Fraktionen separiert. Die Analysen mittels *Western blot* zeigen, dass LAMP1, ein Lysosomen-spezifisches Protein, in Fraktion 4 akkumuliert, während nicht-lysosomale Proteine wie Calnexin und β -Actin nahezu ausschließlich in Fraktion 1-3 vorzufinden sind (Abb.13 D). Daher wurde LAMP1 als interne Proteinkontrolle verwendet, um den BACE Gehalt in Fraktion 4 zu normalisieren.

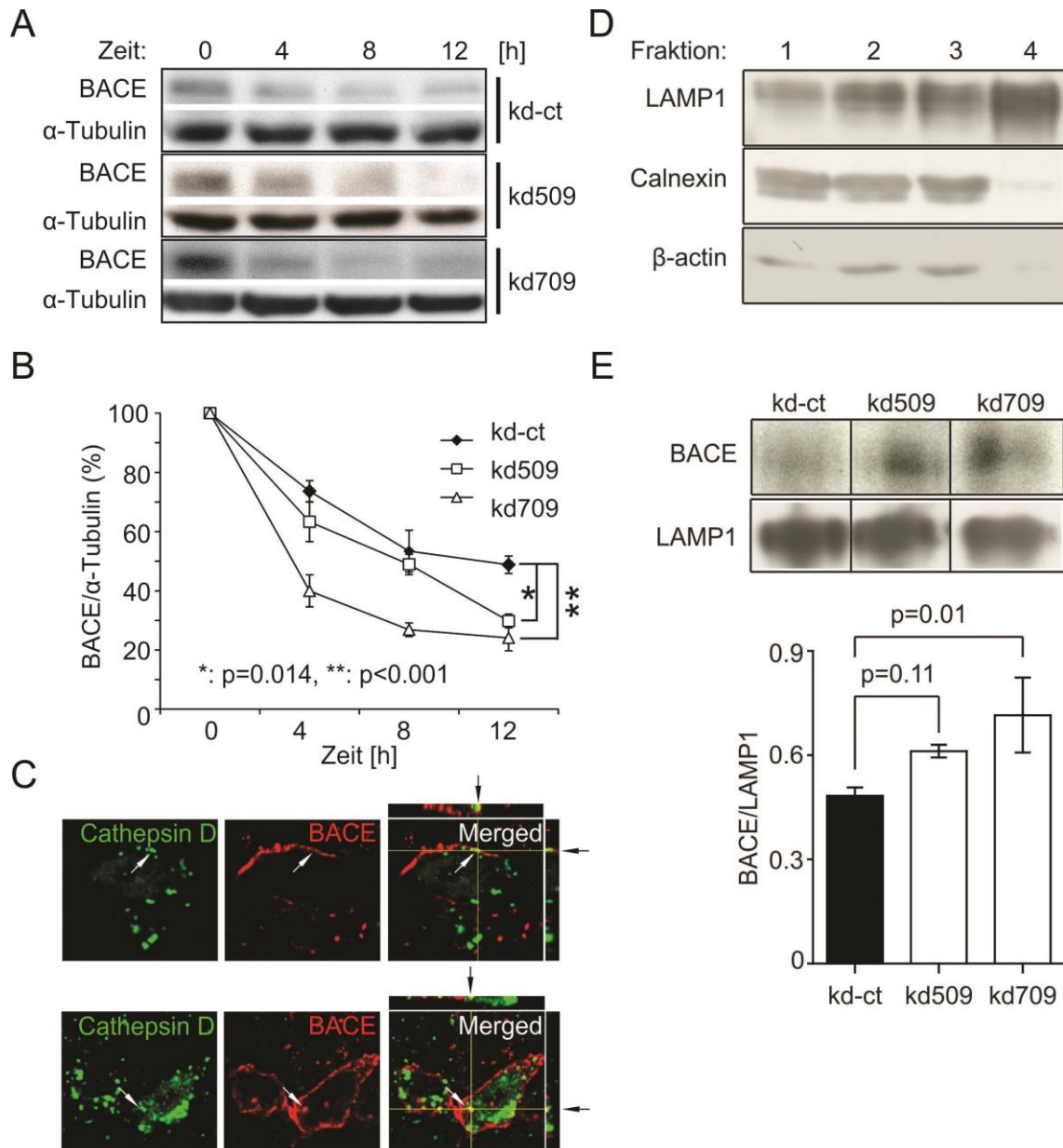


Abbildung 13: p38α-MAPK kd fördert lysosomale Degradation von BACE. p38α-MAPK kd (kd509 oder kd709) und Kontrollzellen (kd-ct) wurden mit Cycloheximid behandelt. Das Zelllysate wurde 0, 4, 8 und 12 h nach Behandlung geerntet. Quantitativer *Western blot* wurde zur Detektion der Proteinlevel von BACE und α-Tubulin, als interne Ladekontrolle durchgeführt (A und B; two way ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=3 pro Gruppe). BACE, gekoppelt an Cy3, kann mit dem lysosomalen Marker Cathepsin D, gekoppelt an Alexa488, in Membrannähe und im Zytoplasma von SHSY5Y Zellen co-lokalisiert werden. (C). Die Lysosomen von kd-ct, kd509 und kd709 wurden mittels Percoll Gradientenzentrifugation isoliert. LAMP-1, Calnexin, und β-Actin der 4 Fraktionen wurden im *Western blot* detektieren (D). Anschließend wurde das Proteinlevel von BACE in Fraktion 4 detektiert und mittels LAMP1 als interner Ladekontrolle quantifiziert (E und F; one way ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=3 pro Gruppe). A, C und D: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

Signifikant mehr BACE wurde in Lysosomen detektiert, die aus p38α-MAPK-kd Zellen isoliert wurden (Abb.13 F; one way ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=3 pro Gruppe). Dies lässt darauf schließen, dass p38α-MAPK kd die

lysosomale Degradation von BACE beschleunigt und erhöht. Interessanterweise korreliert die langsamere Degradation von BACE in den kd509 Zellen, im Vergleich zu den kd709 Zellen (Abb.13 A), mit dem geringeren Proteingehalt von BACE in Lysosomen von kd509 Zellen (Abb.13 E).

3.6 p38 α -MAPK kd hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von BACE

Theoretisch kann BACE durch p38 α -MAPK an Serin oder Threonin phosphoryliert werden, was wiederum den intrazellulären Transport und Degradation von BACE beeinflussen kann. Daher wurde untersucht, ob der verminderte zerebrale A β -Gehalt und die Effekte auf BACE selbst, nach neuronalem p38 α -MAPK kd auf einen unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus von BACE zurückzuführen ist. Zunächst wurde der NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) und die humane Sequenz von BACE mit der UniProt Zugriffsnummer P56817 verwendet, um potentielle Phosphorylierungsstellen bestimmen zu können. Danach kam keine Phosphorylierungsstelle an Threonin durch p38-MAPK in Frage und in dem folgenden Experiment wurde nur die Phosphorylierung von BACE an Serin untersucht.

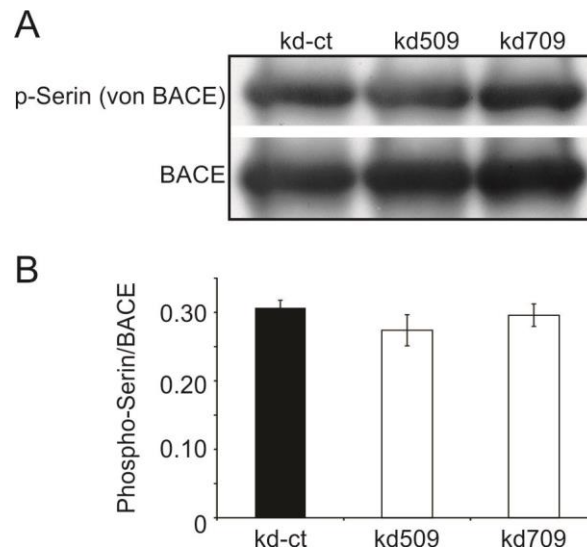


Abbildung 14: p38 α -MAPK kd hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von BACE.

BACE wurde aus Zelllysaten von p38 α -MAPK kd (kd509 oder kd709) und kd-ct mittels BACE (C-Terminal spezifischen) gekoppelt an Protein G Magnetkugeln isoliert und in einen quantitativen *Western blot* eingesetzt. Das Proteinlevel von p-Serin wurde über BACE normalisiert (A und B; one way ANOVA, $p > 0.05$; $n=6$ pro Gruppe). A: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

Nach BACE *pull down* konnte mittels des pSerin-Antikörpers keine Veränderungen in der Serin-Phosphorylierung nach kd von p38 α -MAPK in den kd509 und kd709 Zellen festgestellt werden (Abb.6 A und B; *one way* ANOVA, n=6).

3.7 Reduktion von p38 α -MAPK verstärkt Autophagie im Zell- und im Mausmodell

Der Phosphorylierungsstatus von BACE ist in den p38 α -MAPK defizienten Zellen nicht verändert, daher muss ein anderer molekularer Mechanismus für die erleichterte lysosomale Degradation zuständig sein. p38-MAPK kann die Autophagie durch Phosphorylierung von ATG5 inhibieren (Keil et al., 2013a). Nach dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob umgekehrt eine Reduktion von p38 α -MAPK die Autophagie verstärkt und dadurch die Degradation von BACE einleitet. Aufgrund der in Kapitel 1.5 beschriebenen Aufgaben im Autophagie Prozess von Beclin1 und LC3 werden diese Proteine als Autophagie-Marker herangezogen, um die Rate der Autophagie zu evaluieren. Dabei wird als zusätzliches Standardverfahren das Verhältnis von LC3I und LC3II nach quantitativem *Western blot* ermittelt. Nach der Deletion von p38 α -MAPK in Neuronen APP/PS1^{tg} Mäuse, konnte im RIPA Puffer löslichen Hirnhomogenat dieser Tiere eine verstärkte autophagische Aktivität im Vergleich zu den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Tieren nachgewiesen werden. Konkret war sowohl LC3II als auch Beclin1 in dem APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Tieren (Abb.15 A-C; t-Test; n=11 pro Gruppe, LC3II Δ 23 %; Beclin1 Δ 20 %) und p38 α -MAPK kd SHSY5Y Zellen (Abb.15 D-F; *one way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test; n \geq 5 pro Gruppe, Δ LC3II 35 bzw.55 %; Δ Beclin1 38 bzw. 41 %) signifikant erhöht. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das erhöhte Proteinlevel von LC3 auf eine Beeinträchtigung der Autophagie oder lysosomale Digestion zurückzuführen ist, wurden LC3-GFP-RFP-^{tg} SHSY5Y Autophagie-Reporterzellen mit 0 μ M (DMSO), 10 und 30 μ M p38 α -MAPK Inhibitor SB203580 über 2 h bei 37 °C behandelt. Die Autophagosomen werden durch die grünen Punkte repräsentiert (eine Überlappung mit schwacher roter Fluoreszenz wird mit den Pfeilköpfen angezeigt) und Autolysosome werden durch rote Punkte repräsentiert (angezeigt durch Pfeile) (Abb.15 G).

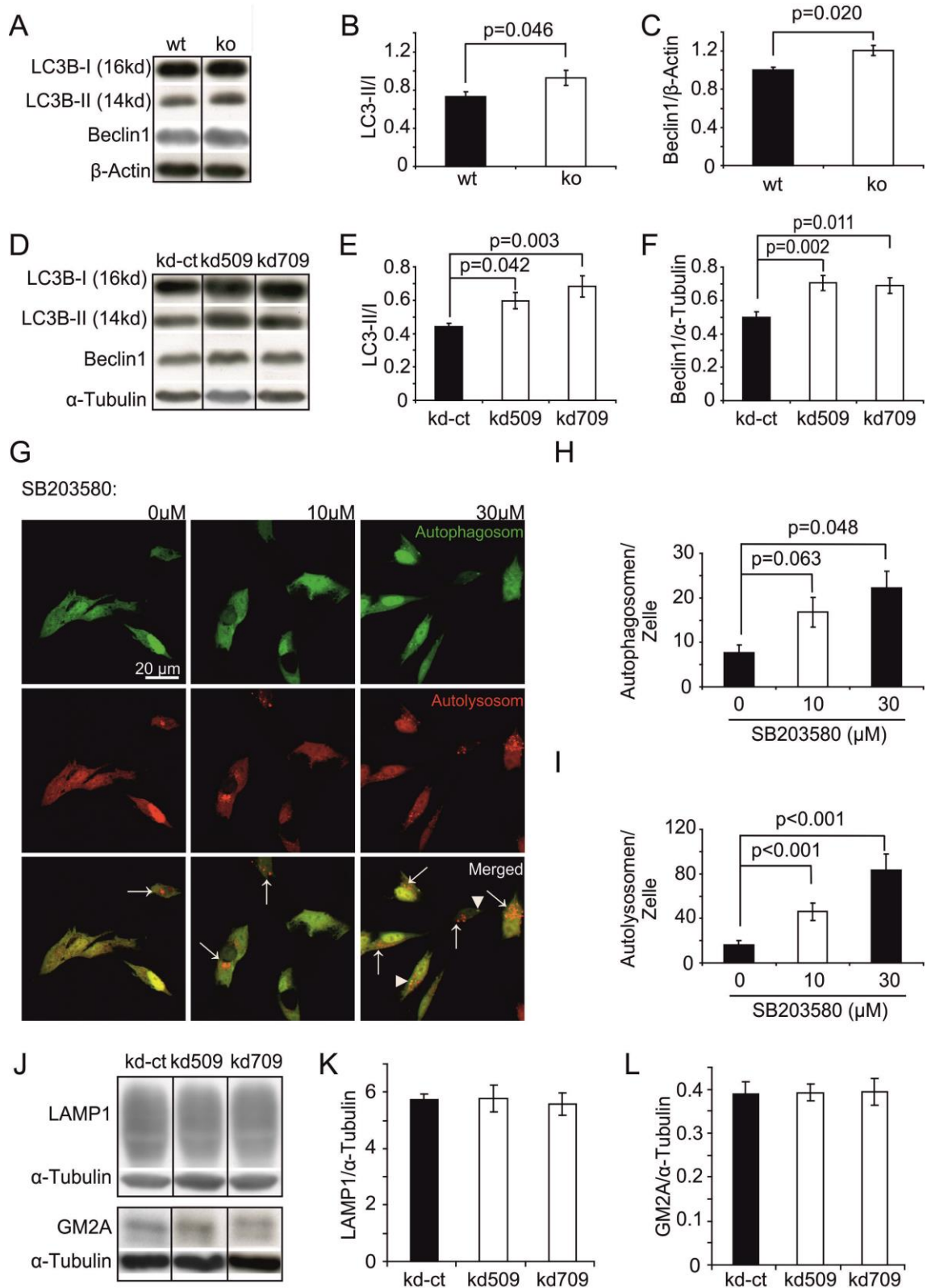


Abbildung 15: Deletion von p38α-MAPK erhöht Autophagie in *vitro* und in *vivo*. Die Aktivität der Autophagie wurde mittels quantitativem *Western blot*, durch Detektion von LC3 und Beclin1 im Hirn APP/PS1^{tg} p38α-MAPK ko und APP/PS1^{tg} p38α-MAPK wt Mäusen (A-C), sowie in p38α-MAPK kd509 bzw. kd709 sowie in kd-ct SHSY5Y Zellen (D-F) ermittelt. Das Verhältnis von LC3-II/I als auch das Proteinlevel von Beclin1 wurden analysiert (B und C: t-Test; n=11 pro Gruppe; E und F: one-way ANOVA gefolgt von Bonferroni post-hoc Test; n≥5 pro Gruppe). Zusätzlich wurden Autophagie-Reporterzellen, die das Fusionsprotein LC3-GFP-RFP exprimieren,

mit dem Inhibitor SB203580 in den Konzentrationen 0, 10 und 30 μM behandelt. Die Autophagosomen sind grün (eine Überlappung mit schwacher roter Fluoreszenz wird mit den Pfeilköpfen angezeigt) und die Autolysosomen sind rot in den konfokalen Bildern dargestellt (angezeigt durch Pfeile) (G). Die Anzahl der Autophagosomen und Autolysosomen wurde nach Behandlung mit SB203580 evaluiert (H und I; one-way ANOVA gefolgt von Dunnett T3 post-hoc Test; $n=4$). Der lysosomale Verdau in p38 α -MAPK-kd (kd509 oder kd709) und Kontroll (kd-ct)-SHSY5Y Zellen wurde mittels *Western blot* durch Detektion von LAMP1 und GM2A in den Zelllysaten ermittelt (J-L; one-way ANOVA, $p>0.05$; $n\geq 5$ pro Gruppe). A, D, oder J: zeigen jeweils repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

Dabei kann beobachtet werden, dass die pharmakologische Inhibition von p38-MAPK die Anzahl der Autophagosomen und Autolysosomen dosisabhängig erhöht (Abb.15 H–I, *one way* ANOVA gefolgt von Dunnett T3 post hoc Test; $n=4$, Δ Autophagosomen 83 % für 10 μM bzw. 180 % für 30 μM SB203580 und Δ Autolysosomen 91 % für 10 μM bzw. 281 % für 30 μM SB203580). Des Weiteren wurde mittels quantitativem *Western blot* die Proteinlevel von LAMP1 und GM2A, welche beide durch Lysosomen degradiert werden (Karaca et al., 2014), in p38 α -MAPK kd und wt SHSY5Y Zellen untersucht. Wie in Abb.15, J-L dargestellt, beeinflusst eine p38 α -MAPK Reduktion die Proteinlevel von LAMP1 und GM2A in SHSY5Y Zellen nicht (*one way* ANOVA, $p>0.05$, $n\geq 5$ pro Gruppe). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine neuronale Deletion von p38 α -MAPK die zerebrale Autophagie definitiv erhöht, ohne dabei das Lysosomen-System zu beeinträchtigen.

3.8 Inhibition der Autophagie verhindert BACE Reduktion nach p38 α -MAPK kd

Als nächstes wurden die Effekte einer Autophagieinhibition auf die, nach der Reduktion von p38 α -MAPK eingeleiteten, BACE Reduktion untersucht. Dazu wurde eine Zelllinie etabliert, die das humane ATG5 in einer wt- und einer dominant-negativen (DN)-Variante überexprimieren. SHSY5Y Zellen wurden mit entsprechenden Vektoren (Mizushima et al., 1998) stabil transfiziert. Nach der Zugabe von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ des Autophagie Aktivators Rapamycin für 24 h in das Zellkulturmedium war in den ATG5 DN^{tg} Zellen das Verhältnis LC3-II/I signifikant geringer als in den ATG5 überexprimierenden Zellen. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die DN-Variante von ATG5 die Autophagie erfolgreich inhibiert. (Abb.16 A und B; t-Test; $p<0.05$). Des Weiteren wurde, in den ATG5 DN^{tg} und den ATG5 wt SHSY5Y Zellen, die Expression von p38 α -MAPK durch liposomale Transfektion, des für den kd709 miRNA-transkribierenden Vektors, reduziert. Im gleichen Experiment wurde 1 mM des Autophagieinhi-

bitors 3MA den ATG5 wt SHSY5Y Zellen, mit (kd709) und ohne (kd-ct) Reduktion von p38 α -MAPK, für 16 h in das Kulturmedium appliziert. Interessanterweise, zeigen beide Ansätze die Autophagie zu inhibieren (3MA Applikation und Überexpression von ATG5 DN^{tg}) im Vergleich der kd-ct Zellen einen signifikanten Anstieg des BACE Proteinlevels. Zusätzlich wird die BACE Reduktion nach kd von p38 α -MAPK in den ATG5-wt kd709 Zellen nach 3MA Applikation und in den ATG5 DN^{tg} kd709 Zellen aufgehoben (Abb.16 C; t-Test; $p < 0.05$).

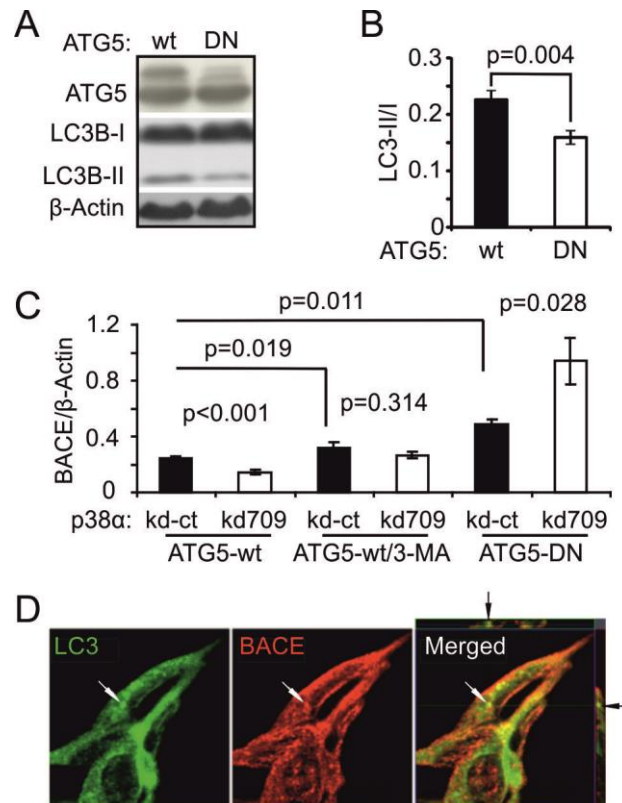


Abbildung 16: Inhibition der Autophagie verhindert BACE Reduktion nach p38 α -MAPK kd. DN und wt human ATG5-Überexprimierende Zelllinien wurden etabliert und die DN Form von ATG5 im qualitativen *Western blot* überprüft (A). Die Autophagie Aktivität dieser Zelllinien wurde nach 0,2 μ g/ml Rapamycin Behandlung für 24 h über Detektion von LC3B(-I und-II) mittels quantitativem *Western blot* ermittelt (A und B). Die Zellen wurden zusätzlich mit dem kd-ct oder dem kd709 für p38 α -MAPK transfiziert. Die ATG5 wt-kd-ct bzw. ATG5wt-kd709 Zellen wurden für 16 h mit 1 mM 3MA inkubiert, um die Aktivität der Autophagie zu inhibieren. Das Proteinlevel von BACE in den kd709 Zellen wurde mittels *Western blot* nach Normalisierung über β -Actin quantifiziert und mit den jeweiligen kd-ct Zellen verglichen (C; t-Test; $n \geq 3$ pro Gruppe). Immunzytochemische Färbungen mittels anti LC3A/B (Alexa 488 gekoppelt, grün) und anti BACE (Cy3 gekoppelt, rot) zeigen eine schwache Co-Lokalisation (gelbe Fluoreszenz) der beiden Proteine im Zytoplasma von SHSY5Y Zellen (angezeigt mit weißem Pfeil) nach Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder (aufgenommen mit 40x Objektiv und 1x Zoom) (D). A: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

In immunzytochemischen Experimenten wurde, mittels konfokaler Mikroskopie eine Co-Lokalisation von BACE mit Autophagievakuolen untersucht. BACE und LC3A/B colokalisieren nur sehr schwach (Abb.16 D) und auch die Behandlung

mit Bafilomycin, welches die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen verhindern soll (Klionsky et al., 2008), veränderten diese Beobachtung nicht.

3.9 Verbesserte kognitive Leistung nach p38 α -MAPK Deletion

Da nach kd von p38 α -MAPK eine beschleunigt Degradation von BACE, sowie ein verminderter A β -Gehalt festgestellt werden konnte, wurde überprüft, ob die Inhibition von p38 α -MAPK zusätzlich einen protektiven Effekt auf Neurone im AD-Mausmodell hat. Daher wurde als kognitiver Test das *Morris water maze* durchgeführt. Dieses Testverfahren beinhaltet die Messung der Latenzzeit (Abb.17 A), der Distanz (Abb.17 B) und, zur Überprüfung der allgemeinen Fitness, die Schwimmgeschwindigkeit (Abb.17 C) der zu testenden Mäuse. Der Lerneffekt über die Trainingstage (A-B), sowie die Gedächtnisleistung (nach einem Tag Pause) am Testtag (Abb.17 D-F), mit Erfassung der Latenzzeit (D), der Frequenz der Plattformbesuche (E) und der Aufenthaltsdauer im Plattformbereich (F), werden unter den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt, APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko und den zugehörigen Kontrolltieren APP/PS1^{wt}p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{wt} p38 α -MAPK ko verglichen. Die Mäuse wurden für die Datenerfassung von A-C an drei unterschiedlichen Punkten, gleicher Reihenfolge in das Wasserbassin eingelassen und am Ende der Mittelwert der drei Punkte pro Maus und schließlich pro Gruppe, errechnet. Die Graphen D-F beziehen sich auf die Mittelwerte von zwei unterschiedlichen Einlasspunkten pro Maus. Die Mäuse adaptierten sich nach einem Trainingstag (Tag 0, fließt nicht in Auswertung mit ein) an die gegebenen Bedingungen und erreichten die Zuflucht mit zunehmender Testdauer stetig schneller. Dies zeigt sich in einer verminderten Latenzzeit und Schwimmstrecke, sodass sich zusammenfassend ein Lerneffekt bei allen Versuchstieren einstellt (A und B). An Tag 1 weisen alle vier Gruppen eine ähnliche Latenzzeit zum Auffinden der Plattform auf. Allerdings benötigen die Kontrolltiere APP/PS1^{wt}p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{wt} p38 α -MAPK ko schon an Tag 2 fast nur noch die Hälfte der Zeit und zurückgelegte Schwimmstrecke als am Vortag. Im Vergleich zu den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko zeigen beide Kontrollgruppen wie zu erwarten, eine bessere kognitive Leistung über die Trainingstage und eine bessere Gedächtnisleistung am finalen Testtag, wobei sich die Schwimmgeschwindigkeit ledig-

lich zwischen APP/PS1^{wt} p38α-MAPK ko und den minimal langsamer schwimmenden APP/PS1^{tg} p38α-MAPK wt zu unterscheiden scheint (C).

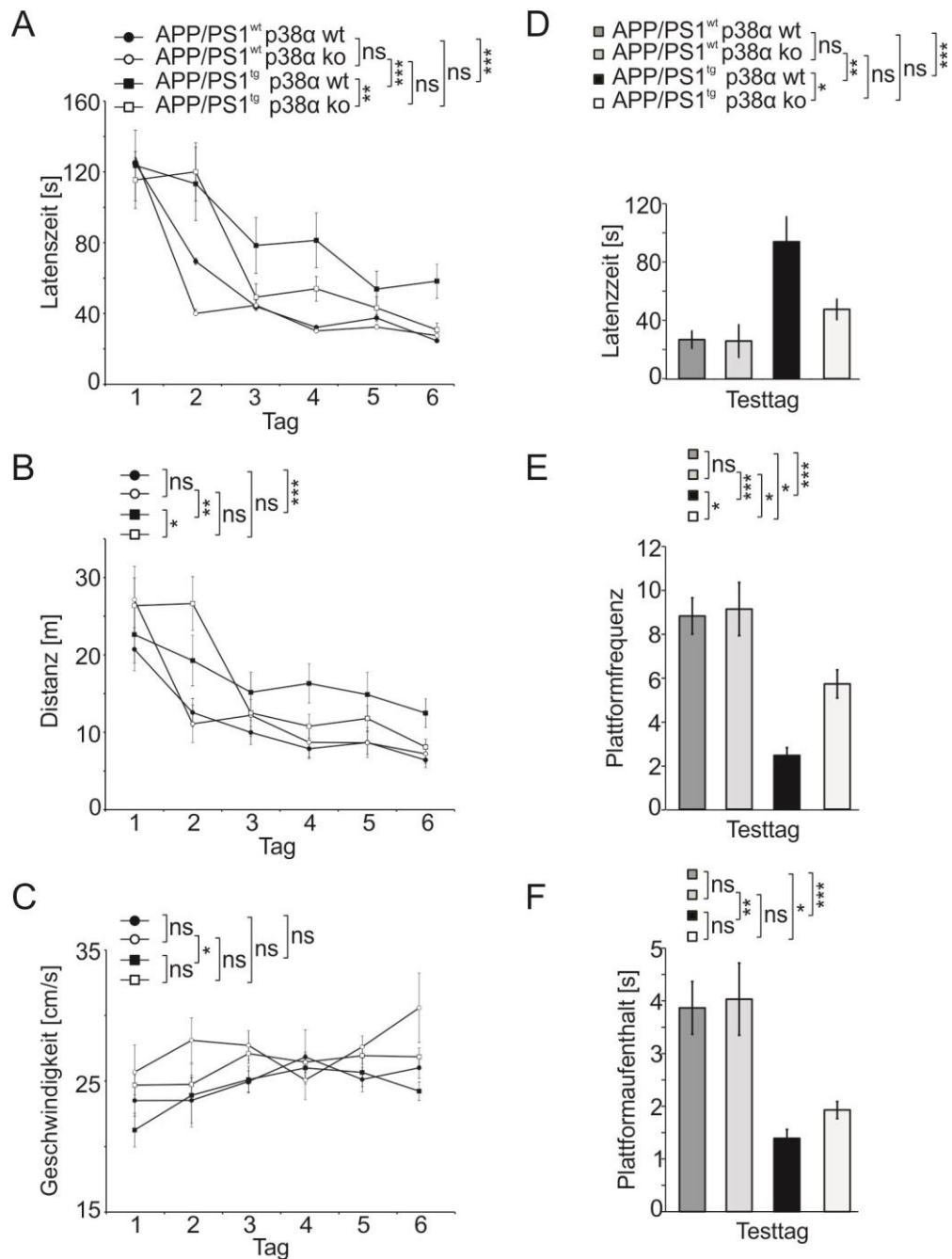


Abbildung 17: Verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung in 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38α-MAPK ko Mäusen. Die Latenzzeit zum Auffinden der Plattform (A) die zurückgelegte Distanz (B) und die Schwimmgeschwindigkeit (C) wurden über die Trainingstage 1-6 für die Kontrollgruppen APP/PS1^{wt} p38α-MAPK wt und APP/PS1^{wt} p38α-MAPK ko und für APP/PS1^{tg} p38α-MAPK ko sowie APP/PS1^{tg} p38α-MAPK wt Mäuse ermittelt (A-C, two way ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$; wt $n \geq 8$). Des Weiteren wurde die Gedächtnisleistung am Testtag in Form von Latenzzeit, Frequenz der Plattformbesuche und Aufenthaltszeit im Plattformbereich evaluiert (D-F, one way ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$; $n \geq 8$).

Dennoch erreichten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäuse die versteckte Plattform ab Tag 3 wesentlich schneller (*two way ANOVA*, $p < 0,001$) und legten dabei im Durchschnitt eine signifikant geringere Strecke (*two way ANOVA*, $p < 0,001$) als ihre APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwister zurück, wobei sie sich nicht in der Schwimmgeschwindigkeit unterschieden (A-C). Interessanterweise konnten die APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäuse einen ähnlichen Lernerfolg am 6. Trainingstag wie beide Kontrollgruppen aufweisen und dadurch die Lerndefizite, welche bekannt sind für APP/PS1^{tg} Mäuse, nahezu aufheben. Des Weiteren, benötigten die APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäuse am Testtag deutlich weniger Zeit zum Auffinden der Plattform und durchquerten den Plattformbereich in einer signifikant höheren Frequenz als ihre APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwister (D-E). Lediglich die Aufenthaltsdauer beider Versuchsgruppen erreichte keine statistische Signifikanz (F).

3.10 Deletion von p38 α -MAPK verbessert die synaptische Integrität

Defizite im Erinnerungsvermögen sowie Hirnatrophie durch degenerierende Synapsen gehören zum Krankheitsbild der AD. Lange vor dem Auftreten dieser Symptome können A β -Aggregate die Plastizität und strukturelle Funktionalität der Synapsen beeinträchtigen (Klyubin et al., 2012). Die APP/PS1^{tg} Mäuse weisen in einem Alter von 9 Monaten ein reduziertes Level an synaptischen Proteinen vor (Liu et al., 2012). Um den Effekt der geringeren synaptischen Integrität zu überprüfen, wurde mittels quantitativem *Western blot* der Proteingehalt von vier typischen prä- bzw. postsynaptischen Markerproteinen in 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt bzw. ko Mäusen quantifiziert: (1) *mammalian uncoordinated 18-1* (Munc), (2) *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP), (3) *synaptophysin* (SYN) und (4) *post synaptic density protein 95* (PSD). Munc, SNAP und SYN waren in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen im Vergleich zu ihren APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwistern signifikant erhöht. PSD zeigte zwar die gleiche Tendenz auf, erreichte allerdings keine statistische Signifikanz (Abb.18 A-E; t-Test; $n \geq 10$ pro Gruppe).

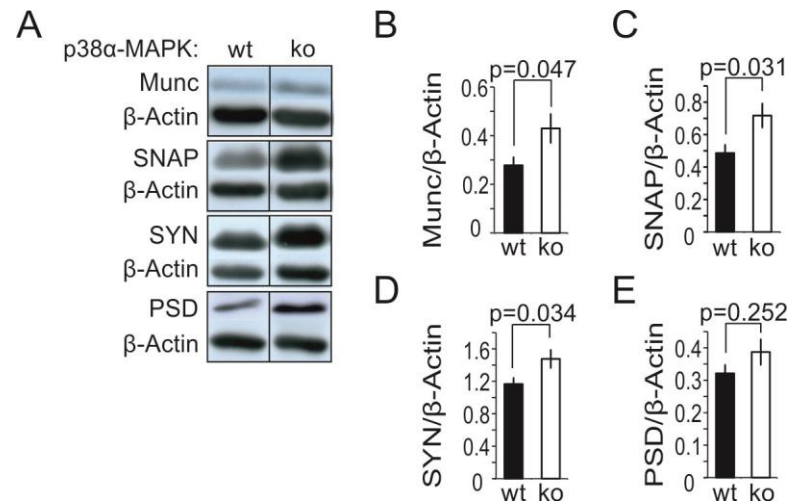


Abbildung 18: p38α-MAPK ko erhöht synaptische Markerproteine in 9 Monate alten APP/PS1^{tg} Mäusen. Munc, SNAP, SYN und PSD wurden in den Hirnhomogenaten mittels quantitativem *Western blot* analysiert. Dazu wurde das Proteinlevel dieser synaptischen Strukturproteine mittels β-Actin normalisiert und zwischen APP/PS1^{tg} p38α-MAPK wt und ko Geschwistern verglichen (A-E, t-Test; $n \geq 10$ pro Gruppe). A: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweiligen gleichen Gels.

3.11 Keine erhöhte Apoptose nach Deletion von p38α-MAPK

Wird p38α-MAPK durch Stress, wie hier im AD-Mausmodell, aktiv, phosphoryliert sie, neben bereits im Kapitel 1.6.2 erwähnten Substraten den Transkriptionsfaktor *CREB* (Tan et al., 1996). CREB selbst übernimmt eine große regulatorische Rolle im Nervensystem und fördert neuronales Überleben. Des Weiteren ist CREB für seine Beteiligung an Lern- und Gedächtnisprozessen bekannt (Guzowski, Mcgaugh, 1997). Mäuse mit einer Defizienz für CREB weisen in sensorischen Neuronen einen Anstieg von Apoptose und Degeneration auf, wobei keine Veränderungen im ZNS zu beobachten sind (Lonze et al., 2002). Um potentielle Nebeneffekte, die durch neuronale Deletion von p38α-MAPK verursacht werden, auszuschließen, wurden diese Tiere hinsichtlich einer erhöhten Apoptoserate analysiert. Dazu wurden 50 µm dicke sagittale Hirnschnitte von 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38α-MAPK wt Mäusen und deren ko Geschwistertieren angefertigt und drei Hirnschnitte pro Maus in einem Intervall von 500 µm mit dem *in situ cell death AP kit* und dem neuronalen Marker NeuN angefärbt. Anschließend wurden die mittels *in situ cell death AP kit* angefärbten, sogenannten TUNEL+ Zellen (grün), und die NeuN positiven Zellen (rot) im Cortex und Hippocampus ausgezählt und mit dem Volumen der beiden Hirnareale normalisiert (Abb.19 A-B; t-Test; $n=4$ pro Gruppe). Interessanterweise,

zeigten die APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäuse tendenziell mehr apoptotische Zellen (weißer Pfeilkopf markiert TUNEL⁺ Zellen) und apoptotische Neurone (weißer Pfeil markiert TUNEL⁺ Neurone), als die APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Geschwistertiere.

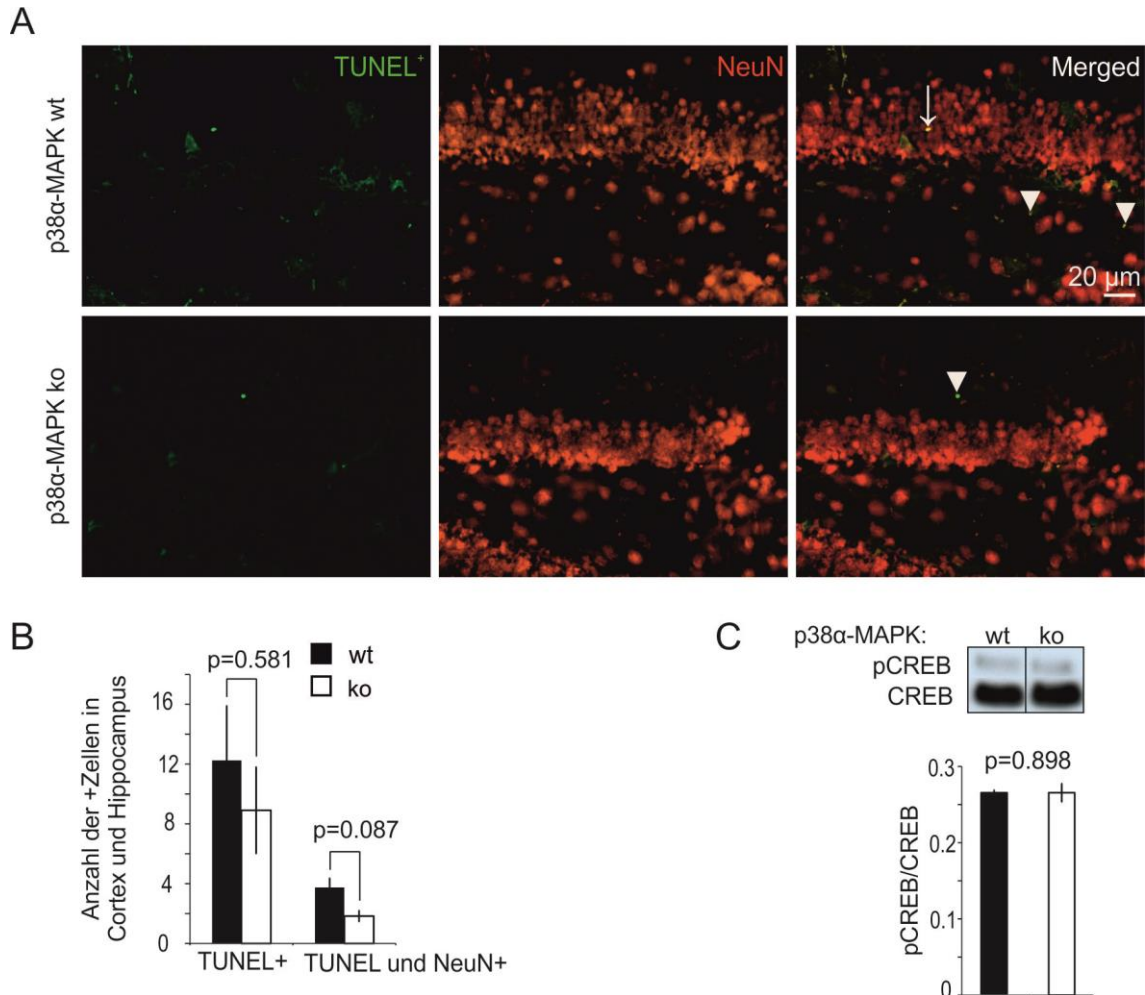


Abbildung 19: Keine apoptotischen Nebeneffekte in APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen.

Um die Apoptoserate von APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt mit ko Mäusen zu vergleichen, wurden 50 μ m dicke Hirnschnitte angefertigt und 3 Schnitte pro Tier, in einem Intervall von 500 μ m mit dem *In situ cell death AP kit* und dem neuronalen Marker NeuN (rot) angefärbt. Alle TUNEL positiven Zellen (weißer Pfeilkopf, grüne Zellen) und Zellen die sowohl TUNEL als auch NeuN positiv sind (weißer Pfeil), wurden in Cortex und Hippocampus ausgezählt (A: 20x Objektiv; B; t-Test; n=4 pro Gruppe). Die Anzahl der positiven Zellen wurden durch das Hirnvolumen angepasst. Des Weiteren wurde mittels quantitativem *Western blot* das Phosphorylierungslevel von CREB (pCREB) in Hirnhomogenaten dieser Tiere überprüft und mit CREB als interner Kontrolle normalisiert (C; t-Test; n \geq 3 pro Gruppe). D: zeigt repräsentative Banden des gleichen Gels.

Insgesamt war die Anzahl der apoptotischer Zellen allerdings gering, weshalb für die Analysen die beiden Hirnareale von Cortex und Hippocampus auch zusammengefasst wurden. Des Weiteren wurde der Phosphorylierungsstatus von CREB ermittelt. Dazu wurde das Hirnhomogenat in einem quantitativen Wes-

tern bot eingesetzt und über Detektion von phospho-CREB (pCREB) und CREB als interne Kontrolle zwischen beiden Genotypen verglichen (Abb.19 C; t-Test; $n \geq 3$ pro Gruppe). Dabei konnte kein Unterschied zwischen beiden Genotypen festgestellt werden.

3.12 Deletion von p38 α -MAPK erhöht Wachstumsfaktoren und reduziert Inflammation

Die Auswirkung einer neuronalen p38 α -MAPK Deletion auf Neuroinflammation wurde zunächst mittels immunhistochemischer Färbung von Iba1 analysiert. Dazu wurde die Anzahl der Iba1 positiven Mikrogliazellen *mittels Optical Fracturinator Workflow* ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb.20 A; t-Test $n \geq 4$ pro Gruppe). Die Anzahl der Iba1-positiven Mikrogliazellen war sowohl im Hippocampus ($\Delta=40\%$) als auch im Cortex ($\Delta=30\%$) signifikant verringert nach homozygoter p38 α -MAPK Deletion (APP/PS1^{tg} p38^(lox/lox)-Cre^(Cre/wt): Hippocampus: $5,72 \pm 0,590$ und Cortex: $4,29 \pm 0,452$ (angepasst durch das zu analysierende Hirnvolumen) und APP/PS1^{tg} p38^(lox/lox)-Cre^(wt/wt) Geschwistertiere: Hippocampus: $9,55 \pm 0,748$ und Cortex: $6,18 \pm 0,553$; Abb.20 B; t-Test; $p < 0,05$). Die Morphologie der Mikroglia schien sich nicht zwischen den Genotypen zu unterscheiden und sowohl aktive Mikroglia (abgerundete Form), als auch inaktive Mikroglia (mehrere feine, unregelmäßige Fortsätze) liegen im Hirn beider Genotypen vor. Insgesamt scheinen in den APP/PS1^{tg} p38 wt Mäusen die Iba1-positiven Mikroglia mehr, um vermutlich A β -Plaques, zu akkumulieren. Die Mikroglia der APP/PS1^{tg} p38 ko Mäuse scheinen hingegen bei gleicher Morphologie eher über die Hirnfläche verteilt und nur seltener zentriert zusammengelagert. Diese Beobachtung korreliert mit dem reduzierten A β -Gehalt nach neuronaler Deletion von p38 α -MAPK in APP/PS1^{tg} Tieren. Mittels TaqMan qRT-PCR wurden die Expressionsprofile von Wachstumsfaktoren (bdnf und igf-1), mikroglialen Inflammationsmolekülen des M1 Profils (nos2, ccl2, tnfr- α und il1- β) und des M2 Profils (arc) von 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt und APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK homozygoten ko Geschwistern untersucht. Beide Wachstumsfaktoren waren in den p38 α -MAPK homozygoten ko Mäusen signifikant erhöht, wohingegen die Inflammationsgene nos2, tnfr- α sowie arc ein signifikant höhere Expression in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäusen aufwiesen (Abb.20 C; t-Test; $n \geq 8$ pro Gruppe).

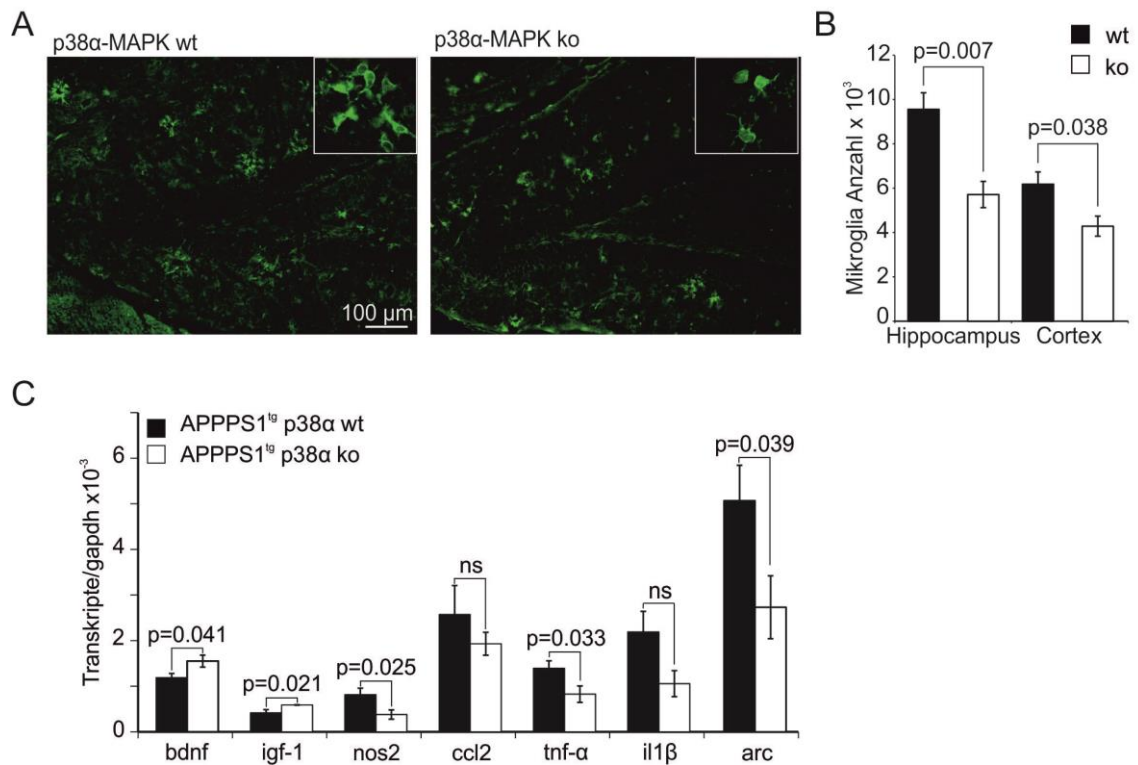


Abbildung 20: p38α-MAPK ko reduziert Mikroglia und Neuroinflammation und ist assoziiert mit erhöhter Genexpression von Wachstumsfaktoren in APP/PS1^{tg} Mäusen. Nach immunfluoreszenter Färbung mit Iba1-spezifischem Antikörper, wurden die Iba1 positiven Mikroglia (grüne Fluoreszenz, 10x und 40x Objektiv) in Hippocampus und Cortex ausgezählt, mit der stereologischen *Optical Fractionator* Methode mit dem entsprechenden Hirnvolumen angeglichen. Die Wachstumsfaktoren bdnf und igf-1 sowie die proinflammatorischen Moleküle nos2, ccl2, tnf-α, il1-β und arc wurden in 9 Monaten alten APP/PS1^{tg} Mäusen mit und ohne ko von p38α-MAPK untersucht t-Test; n>8 pro Gruppe).

3.13 Effekt der Autophagieinhibition auf BACE in ATG5 ko Mäusen

ATG5 ist, auf Grund seiner Rolle bei der Elongation von Autophagosomen, essentiell für eine funktionelle Autophagie-Maschinerie. Wie in Kapitel 3.8 gezeigt, konnte in SHSY5Y Neuroblastoma Zellen, nach Inhibition der Autophagie das BACE Proteinlevel erhöht werden und die Effekte einer p38α-MAPK Defizienz wurden partiell aufgehoben. Diese Ergebnisse wurden, wie nachfolgend gezeigt, sowohl im Tiermodell, als auch in neuronaler Primärkultur überprüft.

3.13.1 Unverändertes BACE Proteinlevel und Aktivität im Hirnhomogenat

Um diese erzielten Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Zucht der ATG5^(lox/lox)-Camk2α Tiere aufgenommen. Das Hirnhomogenat von 3 Monate alten Tamoxifen-induzierbare ATG5 wt und ATG5 homozygoten ko Mäusen, wurden in einem quantitativen *Western blot* eingesetzt. Die Proteinmenge von ATG5 war

nach Normalisierung mit β -Actin als interne Ladekontrolle in den ko Tieren um ca. 40 % reduziert (Abb.21 A; t-Test; $n \geq 5$ pro Gruppe).

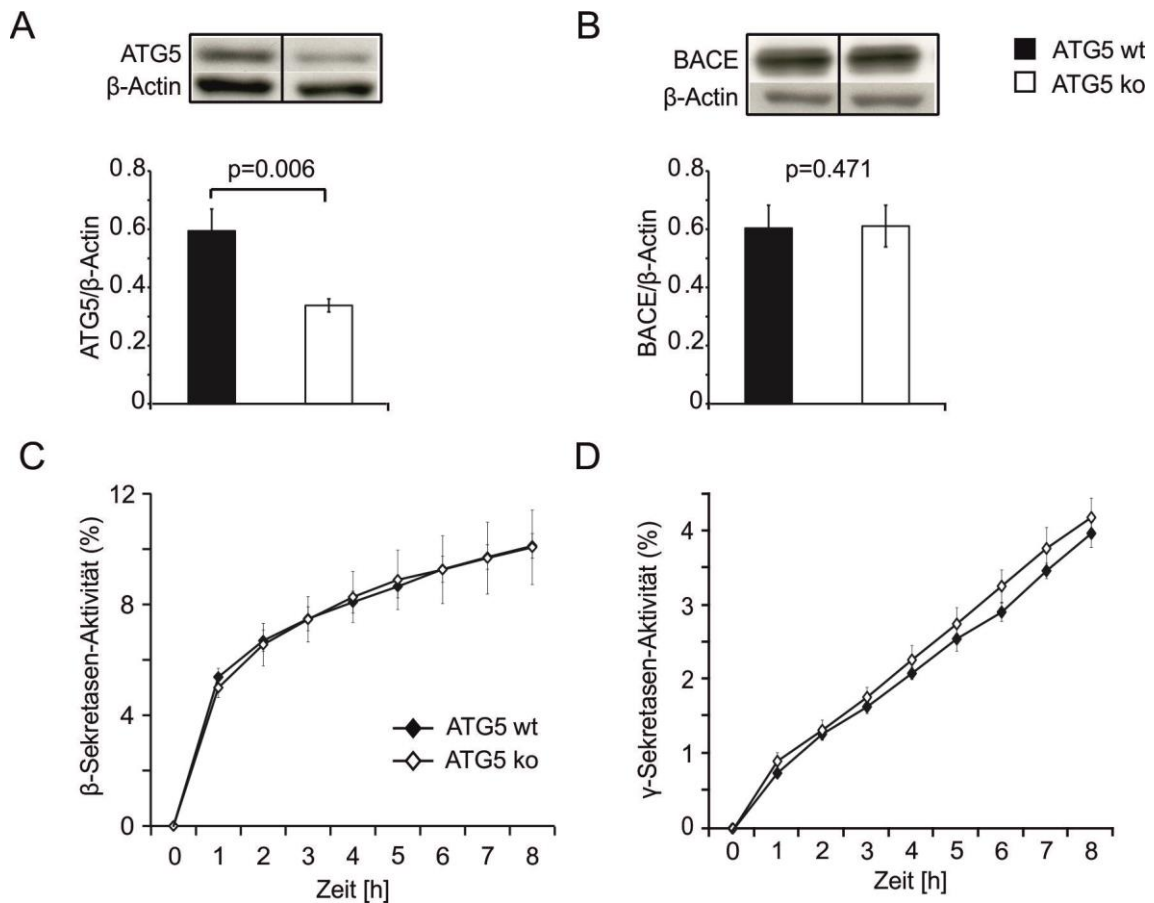


Abbildung 21: Unverändertes BACE Proteinlevel und Sekretasen-Aktivität nach ATG5 ko. Mittels quantitativem *Western blot* wurden die Proteinlevel von ATG5 und BACE nach jeweiliger Normalisierung gegen β -Actin in ATG5 wt und ATG5 ko Mäusen analysiert (A und B, t-Test $n \geq 5$). Zusätzlich wurde die Aktivität der β - und γ -Sekretasen überprüft (C und D, two-way ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test zwischen den Genotypen; $n \geq 3$). A und B: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

Nach der verifizierten Reduktion von ATG5 in den ATG5 homozygoten ko Mäusen, wurde ebenfalls mittels quantitativem *Western blot* das Proteinlevel von BACE untersucht. Entgegen der *in vivo* erzielten Ergebnisse, war nach der Reduktion von ATG5, also der genetischen Inhibition der Autophagie, das Proteinlevel von BACE im Vergleich zu den wt Geschwistertieren unverändert (Abb.21 B; t-Test; $n \geq 5$). Dies ist vermutlich auf die unveränderte Expression von BACE in nicht-neuronalen Zellen, wie Astrozyten und Mikroglia zurückzuführen (Hao et al., 2011). Des Weiteren wurde der Effekt einer Autophagieinhibition auf die Aktivität der β - und γ -Sekretasen-Aktivität untersucht. Diese waren zwischen den Genotypen unverändert (Abb.21 C und D; two way ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test zwischen den Genotypen; $n \geq 3$).

3.13.2 Negative Korrelation von BACE und ATG5 Proteinlevel in isolierten Neuronen

Da die Hirnhomogenate ein Gemisch aus mehreren Zellpopulationen repräsentieren, wurden E14-16 alten Embryonen des Stammes ATG5^(lox/lox)-CamK2 α -CreERT Neuronen isoliert und kultiviert. Um die Deletion von ATG5 einzuleiten, wurde Tamoxifen in einer Konzentration von 800 nM in das Neurobasalkulturmedium appliziert. Diese Neuronen wurden nach einer Deletionsdauer von 10 d geerntet und mittels quantitativem *Western blot* abermals auf die Proteinlevel von ATG5 und BACE hin untersucht. Die Normalisierung der Proteinbanden erfolgte über α -Tubulin als interne Ladekontrolle.

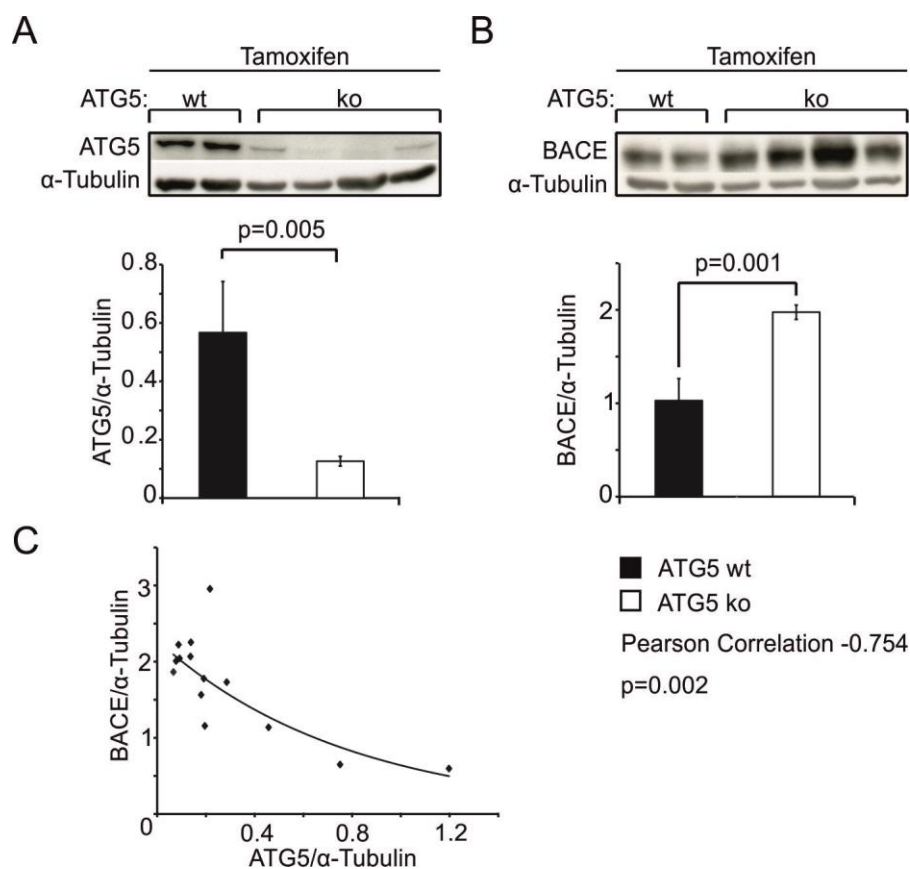


Abbildung 22: Negative Korrelation zwischen BACE- und ATG5-Proteinlevel in neuronaler Primärkultur. Mittels quantitativem *Western blot* wurden die Proteinlevel von ATG5 und BACE nach jeweiliger Normalisierung gegen α -Tubulin in ATG5 wt und ATG5 ko Neuronen analysiert (A und B, t-Test; $n \geq 4$). Zusätzlich wurde der Zusammenhang von ATG5 und BACE Proteinlevel nach Pearson in Korrelation gesetzt (C, Pearson Correlation mit negativer Korrelation von -0,754 und $p=0,002$). A und B: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweiligen gleichen Gels.

Die Auswertung des ATG5 Proteinlevels verdeutlichte, die nach Genotypisierung erlangten Resultate, dass unter den Embryonen sowohl ATG5 wt, als auch ATG5 homozygote ko Genotypen vorhanden waren. In diesen Zelllysaten wur-

de ebenfalls das Proteinlevel von BACE untersucht. Dieses Experiment wurde drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Repräsentative Proteinbanden eines Experimentes sind in Abb. 22 dargestellt (Abb.22 A und B; t-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). Die Analysen zeigen, dass nach Reduktion von ATG5 durch Tamoxifen Applikation in das Kulturmedium, das Proteinlevel von BACE im Vergleich zu den Tieren mit hohem bzw. normalem ATG5 Proteinlevel signifikant ansteigt. Dieser Zusammenhang, zwischen ATG5 und BACE Proteinlevel, wurde nach Pearson in Korrelation gesetzt und zeigt eine negative Korrelation von hoher Stärke zwischen ATG5 und BACE Proteinlevel (Abb.22 C; Korrelation nach Pearson; $n=13$). Je höher das detektierte ATG5 Proteinlevel in den kultivierten Neuronen, desto geringer ist das zu detektierende BACE Proteinlevel. Das bedeutet, eine hohe Autophagie Aktivität begünstigt die Degradation von BACE.

3.14 **p38 α -MAPK kd reduziert BACE Glykosylierung und MGAT3 Phosphorylierung**

Nach der Beobachtung, dass die Autophagie die BACE Degradation verstärkt, wurde untersucht, ob andere molekulare Mechanismen existieren, welche den Abbau von BACE beeinflussen. Da von BACE bereits bekannt ist, dass es nach fehlender Glykosylierung als instabile Proteinform in den Lysosomen abgebaut wird, stellte sich die Frage, ob in den kd Zellen für p38 α -MAPK die Glykosylierung von BACE verändert ist und falls ja, ob das Enzym, welches für die Glykosylierung selbst verantwortlich ist, einen veränderten Phosphorylierungsstatus aufweist. Zunächst wurden neuronale Primärkulturen für 16 h mit 30 μ M des p38-Inhibitors SB203580 inkubiert und anschließend in einem qualitativen *Western blot* eingesetzt. Dabei wurde ein Glykosylierungs-Shift der BACE-Bande beobachtet (Abb.23 A). Die glykosylierte Form von BACE, der unbehandelten Neurone, durchläuft das SDS-PAGE schneller, als die Neurone nach p38 Inhibition. Dies bedeutet, dass nach Inhibition von p38 vermehrt die unglykosylierte Form (größeren Molekulargewichts (Kizuka et al., 2015a)) von BACE detektiert wird und daher p38-MAPK den Glykosylierungsvorgang selbst beeinflusst. Um dies zu verifizieren, wurden Pellets von p38 α -MAPK kd-ct, kd709 und kd509 SHSY5Y Zellen geerntet und lysiert. Aus dem Zelllysate wurde nach einem *pre-clearing* mit den zu verwendenden Protein G magnetischen Kügelchen, entweder BACE oder Threonin in einem *pull down*-Assay konzentriert und das isolier-

te Protein der unterschiedlichen Zelllinien in einem quantitativen *Western blot* analysiert. Um zu testen, ob die Glykosylierung von BACE nach kd von p38 α -MAPK verändert ist, wurde der Antikörper gegen Lektin/GSLII verwendet. Dieser bindet an den Zuckerrest Bisecting GlcNAc, welcher wiederum nach Glykosylierung durch MGAT3 an BACE gebunden ist, und gibt somit Rückschluss über den Glykosylierungsstatus von BACE. Da das BACE Proteinlevel in den kd709 oder kd509 Zellen im Vergleich zu den kd-ct Zellen reduziert ist, ist auch eine reduzierte Menge an GSLII nach BACE *pull down* zu erwarten. Deshalb muss das GSLII Proteinlevel über das BACE Proteinlevel normalisiert werden.

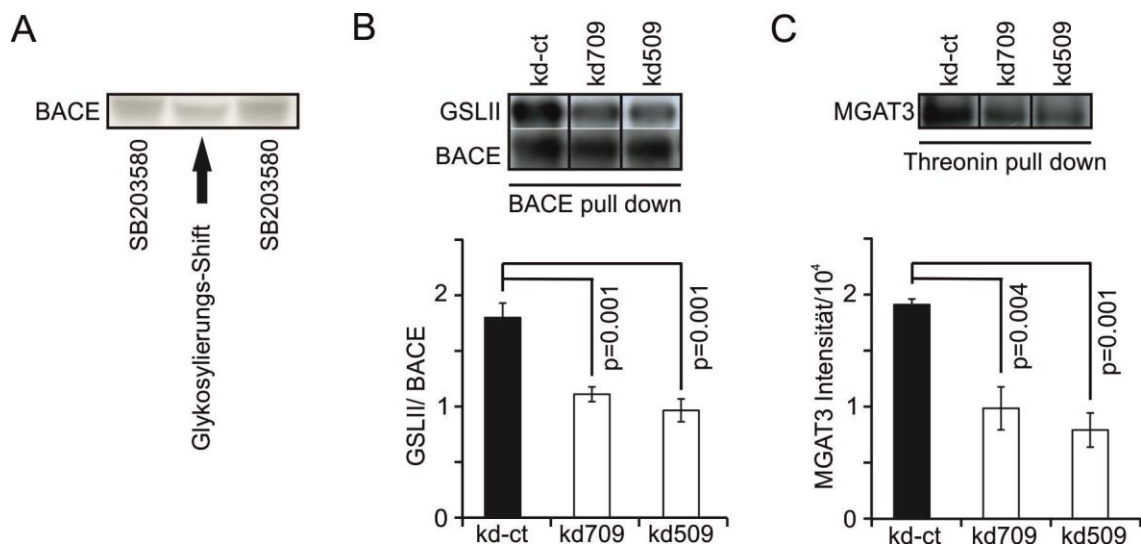


Abbildung 23: Vermindertes GSLII Proteinlevel und MGAT3 Phosphorylierung nach p38 α -MAPK kd. Nach Inhibition von p38-MAPK (SB203580) in neuronalen Primärkulturen, wird vor allem die unglykosylierte Form von BACE im qualitativen *Western blot* detektiert (A). Die Lysate von p38 α -MAPK kd-ct, kd709 und kd509 Zellen wurden einem *pull down* mittels BACE unterzogen und nach *Western blot* die Proteinmenge von GSLII nach Normalisierung gegen das BACE Proteinlevel ermittelt (B *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test $n \geq 3$). Des Weiteren wurden Zelllysate dieser Zelllinien einem Threonin *pull down* unterzogen und nach *Western blot* die Proteinmenge von MGAT3 ermittelt (C, *one way ANOVA* gefolgt von Tukey post hoc Test; $n=4$). A und B: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Gelabschnitte.

Die kd-ct Zellen wiesen dabei ein bis zu 30 % höheres Proteinlevel an GSLII auf als die kd709 oder kd509 Zellen (Abb.23 B, *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $n \geq 3$). Der NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) und die humane Sequenz von MGAT3 mit der UniProt Zugriffsnummer Q09327 wurden verwendet, um potentielle Phosphorylierungsstellen vorhersagen zu können. Diese Recherchen belegen, dass MGAT3 theoretisch von p38 α -MAPK über Threonin an Stelle 261 phosphoryliert werden kann. Nach Threonin *pull down* wurde das Proteinlevel von MAGT3 in den p38 α -

MAPK kd und ct Zellen verglichen. Dieses war in den kd-ct um 100 % erhöht (Abb.23 C, *one way* ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=4).

3.15 **MGAT3 kd mittels CRISPR/Cas9-Methode reduziert BACE Proteinmenge**

Zunächst wurde mittels der CRISPR/Cas9-Methode MGAT3 in SHSY5Y Zellen reduziert. Dazu wurde das Kontrollkonstrukt kd-ct, die beiden Konstrukte die sich gegen die MGAT3 Sequenz richten, kdT1 und kdT2 mittels des CRISPR/Cas9/CD4-positiven Vektors in SHSY5Y Zellen transfiziert. Die Transfektionsstabilität wurde mehrfach mittels quantitativem *Western blot* und FACS Analysen (Daten nicht gezeigt) überprüft. Dabei zeigte sich, dass die transfizierten Zellen die Konstrukte für den MGAT3 kd nach einigen Tagen nicht mehr exprimierten bzw. die nicht-transfizierten, die transfizierten Zellen überwuchsen. Deshalb wurde eine Co-Transfektion der Konstrukte kd-ct, kdT1 bzw. kdT2 und einem Vektor der die Resistenz für das Antibiotika Hygromycin und rote Fluoreszenzprotein DsRed beherbergt in einem Verhältnis 4:1 in die SHSY5Y Zellen transfiziert. Sind die Zellen DsRed-Hygromycin positiv, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass sie auch positiv für die CRISPR-vermittelte MGAT3 kd Transfektion sind. Der Vorteil dieses Versuchsansatzes ist, dass die Zellen direkt von Beginn an mit Hygromycin selektiert werden können. Nach Selektion der positiv-transfizierten Zellen mittels Hygromycin, wurden die CRISPR/CAS9/CD4-positiven Zellen über CD4-gekoppelte Magnetkugeln isoliert und konzentriert. Ein Teil dieser Zellen wurde weiter in Kultur genommen, um die Zellen für den Einsatz in dem quantitativen *Western blot* zu ernten. Der andere Teil wurde einer CD4 Färbung unterzogen und die Zellen mittels FACS-Messungen analysiert. Mittels quantitativem *Western blot* konnte eine signifikante Reduktion von MGAT3, um bis zu 50 % für die kdT1 und bis zu 60 % für die kdT2 Zellen gegenüber den kd-ct Zellen, ermittelt werden (Abb.24 A; *one way* ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=4).

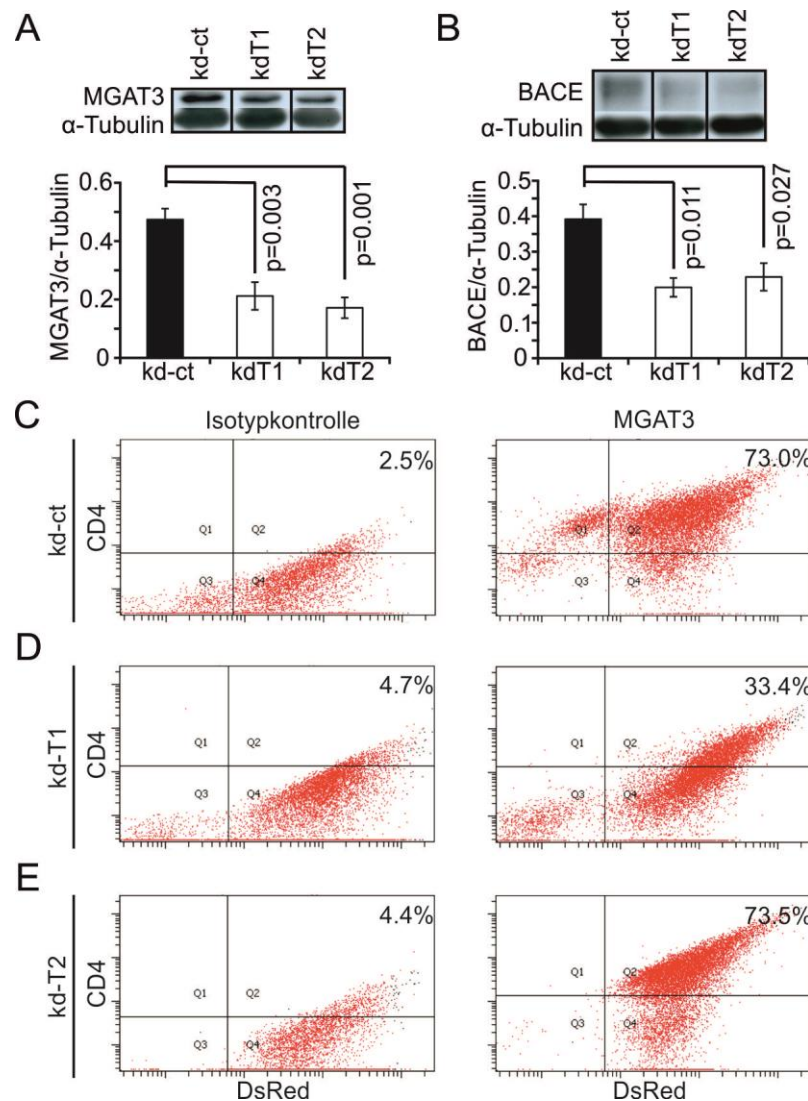


Abbildung 24: Vermindertes BACE Proteinlevel nach MGAT3 kd. Die Zellysate von kd-ct, kdT1 und kdT2 für MGAT3 wurden mittels quantitativen *Western blot* und Normalisierung über α -Tubulin, hinsichtlich des MGAT3 und BACE Proteinlevels untersucht (A und B; *one way* ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=4). Des Weiteren wurden die Zellen mit einem an PerCP-gekoppelten CD4 Antikörpers bzw. einer entsprechenden Isotypkontrolle fluoreszenzgefärbt und mittels FACS der Transfektionserfolg vermessen (C-E). A und B: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

Wie erwartet war das BACE Proteinlevel, nach Normalisierung über α -Tubulin, in den kdT1 und den kdT2 Zellen signifikant reduziert gegenüber den kd-ct Zellen (Abb.24 B; *one way* ANOVA gefolgt von Tukey post hoc Test; n=4). Des Weiteren wurden die kd-ct, kdT1 und kdT2 Zellen mittels eines humanen CD4 Antikörpers bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle, jeweils gekoppelt an einen PerCP fluoreszenten Sekundärantikörper, gefärbt und die Zellen mittels FACS vermessen (Abb.24 C-E). Zunächst wurden ungefärbte Zellen verwendet, um den *forward*- und *sideward scatter* einzustellen. Anschließend wurden die mittels der Isotypkontrolle gefärbten Zellen vermessen, um diesen Wert als Hin-

tergrundsfärbung zu definieren. Nun wurde ein Vier-Quadranten (Q)-Gate gesetzt, welches in Q2 die CD4 positiven Zellen, in Q2 die gewünschte Population der CD4 und DsRed-positiven Zellen, in Q3 die ungefärbten Zellen und in Q4 die DsRed-positiven Zellen alleine anzeigt. Nach diesen festgelegten Parametern wurden die CD4 angefärbten Zellen vermessen, wobei kd-ct und kdT2 einen deutlichen Anstieg der CD4 und DsRed-positiven Zellen in Q2 vorweisen. Für diese beiden Zelllinien liegt der Transfektionserfolg bei ca. 73 % (C und D). Hingegen war die Transfektion für kd-T1 weniger erfolgreich, denn die Anzahl der CD4-DsRed-positiven Zellen betrug bei der Transfektionskontrolle mittels FACS-Färbung nur ca. 33 %. Aus diesen Gründen wurde für die nachfolgenden Experimente lediglich die stärkeren MGAT3 kdT2 Zellen verwendet und die Stabilität der Transfektion mittels mikroskopischer Sichtkontrolle der Fluoreszenz (siehe dazu Anhang Abb. 32) und quantitativem *Western blot* gegen MGAT3 überprüft.

3.16 **MGAT3 kd hebt die Reduktion des BACE Proteinlevels nach p38 α -MAPK kd auf**

Der kd von p38 α -MAPK erzeugt eine Reduktion des BACE Proteinlevels. In wie weit dies mit der Aktivität, also der Phosphorylierung von MGAT3 über p38 α -MAPK zusammenhängt, soll in dem nachfolgenden Versuch analysiert werden. Wenn p38 α -MAPK die Degradation von BACE ausschließlich über die Phosphorylierung von MGAT3 steuert, wäre anzunehmen, dass in den Zellen mit Defizienz für MGAT3, den kdT2 Zellen, der kd von p38 α -MAPK keine Reduktion des BACE-Proteinlevels mehr evozieren kann. Deshalb wurde nach erfolgreicher Etablierung des MGAT3 kd in SHSY5Y Zellen (Abb.25 A, t-Test; n=21), die kd-ct und kdT2 Zellen zusätzlich mit dem Kontrollkonstrukt für p38 α -MAPK kd (kd-ct) und den kd-Konstrukten kd709 und kd509 transfiziert. Der erfolgreiche kd von p38 α -MAPK jeweils in den MGAT3 kd-ct und den MGAT3 kd-T2 Zellen wurde mittels quantitativem *Western blot* überprüft (Abb.25 B, *one way* ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Test; n \geq 5). Die Intensitäten der Banden für p38 wurden dazu mittels α -Tubulin als interner Ladekontrolle normalisiert und sowohl MGAT3 kd-ct als auch MGAT3 kd-T2 zeigen eine stärkere kd-Effizienz für das Konstrukt kd509, welches in einer Reduktion an p38 α -MAPK von bis zu 50 % für die MGAT3 kd-ct und bis zu 65 % für die MGAT3 kd-T1 Zellen resul-

tiert. Die Detektion des Proteinlevels von BACE fand mittels quantitativem *Western blot* nach kd von p38 α -MAPK in den MGAT3 transfizierten Zellen statt. Verglichen wurde BACE zum einen nach p38 α -MAPK kd in den MGAT3 kd-ct Zellen und zum anderen in den MGAT3 kd-T2 Zellen, nach Normalisierung gegen α -Tubulin (Abb.25 C, *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $n \geq 5$). Diese Analyse zeigte erwartungsgemäß, eine deutliche Reduktion des BACE Proteinlevels von bis zu 47 % für die MGAT3 kd-ct-kd509 Zellen gegenüber den MGAT3 kd-ct-kd-ct Zellen, nach Reduktion von p38 α -MAPK. Interessanterweise stieg in den MGAT3 kd-T2 Zellen das Proteinlevel von BACE nach p38 α -MAPK Reduktion an. Dieser Anstieg im BACE Proteinlevel betrug in den MGAT3 kd-T2 Zellen mit dem kd709 Konstrukt für p38 α -MAPK, welcher eine Reduktion von ca. 40 % erreichte, einen statistisch vernachlässigbaren Wert. Hingegen weist der effizientere kd von p38 α -MAPK mit dem Konstrukt 509, mit einer Reduktion von p38 α -MAPK um ca. 65 %, einen Anstieg des BACE Proteinlevels um ca. 40 % auf.

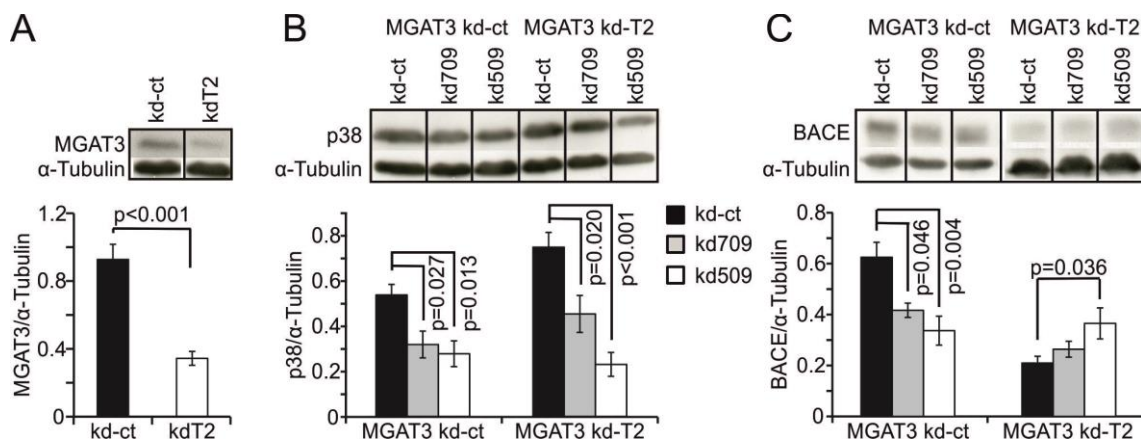


Abbildung 25: Erhöhtes BACE Proteinlevel in MGAT3 kd-T2 nach p38 α -MAPK kd. Mittels quantitativem *Western blot* wurde das Proteinlevel von MGAT3 in den kd-ct und den kdT2 Zellen überprüft (A, t-Test; $n=21$). Nach erfolgreicher Reduktion, wurden beide Zelllinien mit den Kontrollkonstrukt für p38 α -MAPK (kd-ct) und den beiden kd Konstrukten kd709 und kd509 transfiziert. Die erfolgreiche Reduktion von p38 α -MAPK wurde ebenfalls mittels quantitativem *Western blot* überprüft (B *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $n \geq 5$). Anschließend wurde das BACE Proteinlevel in allen sechs unterschiedlichen Zelllinien überprüft (C, *one way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test; $n \geq 5$). A-C: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

3.17 Inhibition der Autophagie nach MGAT3 kd erhöht BACE Proteinlevel

Um den Effekt der Autophagie, im Zusammenhang mit der Glykosylierung, auf die BACE Degradation zu analysieren, wurde die Autophagie schließlich in MGAT3 kd Zellen inhibiert. Ob eine Inhibition der Autophagie das BACE Proteinlevel auch in den MGAT3 kd-T2 Zellen beeinflusst, also ob sich beide Me-

chanismen gegenseitig beeinflussen oder unabhängig voneinander agieren, wurden in diesen beiden Zelllinien analysiert. Dazu wurden die Zellen mit 1 mM 3MA im Kulturmedium für 16 h inkubiert. Das Proteinlevel von BACE wurde mittels quantitativem *Western blot* nach kd von MGAT3, mit und ohne 3MA Behandlung, sowie in kd-ct Zelllysaten nach Normalisierung gegen β -Actin ermittelt (Abb.26 A und B, t-Test; $n \geq 7$). Diese Analyse zeigt in den MGAT3 kd-ct Zellen, nach Applikation von 3MA, wie erwartet ein bis zu 80 % gesteigertes BACE Proteinlevel. Interessanterweise konnte nach 3MA Applikation das BACE Proteinlevel ebenfalls in den kd-T2 Zellen um 60 % gesteigert werden. Trotz verminderter Glykosylierung wird BACE in seiner instabilen Form nicht mehr so schnell abgebaut, was eine Beteiligung der Autophagie bei der BACE Degradation bestätigt.

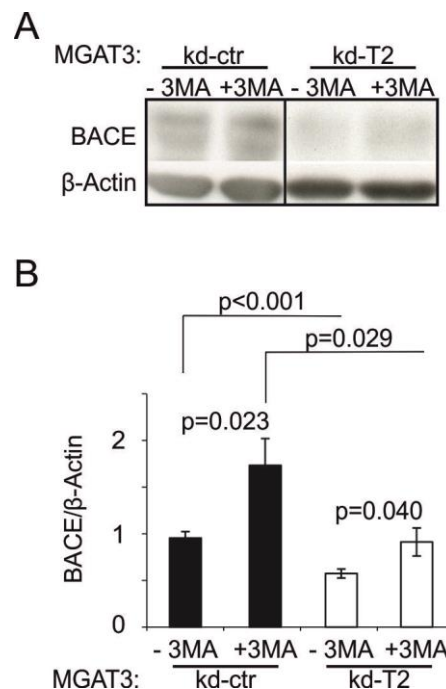


Abbildung 26: Autophagieinhibition erhöht BACE Proteinlevel nach MGAT3 kd. Mittels quantitativem *Western blot* wurde das Proteinlevel von BACE in den kd-ct und den kd-T2 Zellen mit und ohne Zugabe von 1 mM 3MA über 16 h überprüft (A und B, t-Test; $n \geq 7$). A: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

3.18 Verbesserte kognitive Leistung nach p38 α -MAPK Deletion in Tau^{tg} Mäusen

Um den Effekt einer neuronalen p38 α -MAPK Deletion auf das zweite AD-typische Charakteristikum, nämlich die NFTs, zu überprüfen, wurden Tau^{tg} Mäuse mit p38^(lox/lox) Mäusen verpaart und wie bereits in Kapitel 2.3.1 beschrieben die kognitive Leistung evaluiert. Wie zu erwarten war, konnte eine neurona-

le p38 α -MAPK Deletion die Latenzzeit (A) und die Schwimmdistanz (B) bei gleicher Geschwindigkeit zwischen den Genotypen (C) während den Testtagen signifikant verringern (Abb.27 A-C; *two way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test zwischen den Genotypen; $n \geq 8$). Auch am Testtag zeigten die Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Tiere eine bessere Gedächtnisleistung (Abb.27 D-G; t-Test; $n \geq 8$) in Form von geringerer Latenzzeit (D), höherer Plattform-Frequenz (E) und –Aufenthaltsdauer (F). Die neuronale Reduktion von p38 α -MAPK betrug bei diesen Tieren > 70 % gegenüber ihren Tau^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwistern (Abb.27 G, t-Test; $n \geq 8$).

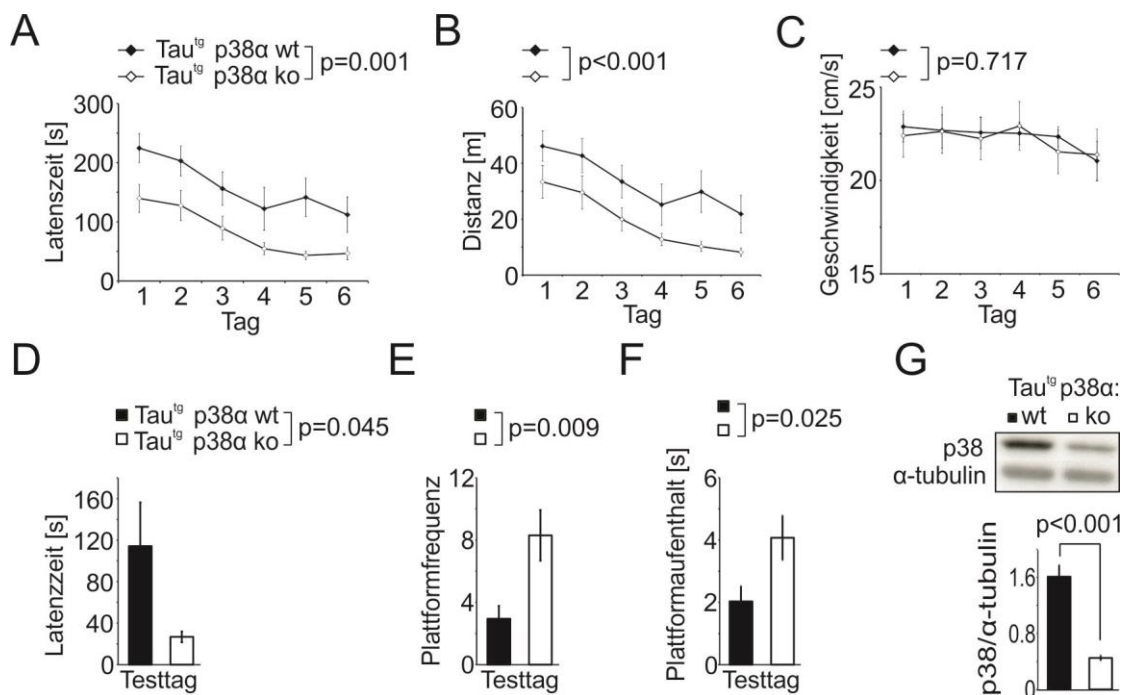


Abbildung 27: Verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung in Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen. Die Latenzzeit zum Auffinden der Plattform (A) die zurückgelegte Distanz (B) und die Schwimgeschwindigkeit (C) wurden über die Trainingstage 1-6 hinweg für Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Mäuse sowie Tau^{tg} p38 α -MAPK wt Mäuse ermittelt (A-C, *two way ANOVA* gefolgt von Bonferroni post hoc Test mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$; $n \geq 8$). Des Weiteren wurde die Gedächtnisleistung am Testtag in Form von Latenzzeit (D), Plattform-Frequenz (E) und -Aufenthaltsdauer (F) evaluiert (D-F, t-Test; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$; $n \geq 8$). Die Hirnhomogenate beider Genotypen wurden in einen quantitativen *Western blot* eingesetzt (G) und das Proteinlevel von p38 detektiert (G, t-Test *** $p < 0,001$; $n \geq 8$). G: zeigt repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des gleichen Gels.

3.19 Deletion von p38 α -MAPK verbessert die synaptische Integrität in Tau^{tg} Mäusen

Mittels quantitativem *Western blot* wurde der Proteingehalt von den typischen prä- und postsynaptischen Markerproteinen (1) Munc, (2) SNAP, (3) SYN und (4) PSD in 9 Monate alten Tau^{tg} p38 α -MAPK wt bzw. ko Mäusen quantifiziert:

Munc, SYN und PSD waren, nach Normalisierung über β -Actin bzw. α -Tubulin, in den Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen, im Vergleich zu ihren Tau^{tg} p38 α -MAPK wt Geschwistern, signifikant erhöht. Für das Proteinlevel von SNAP konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abb.28 A-D; t-Test; $n \geq 5$ pro Gruppe).

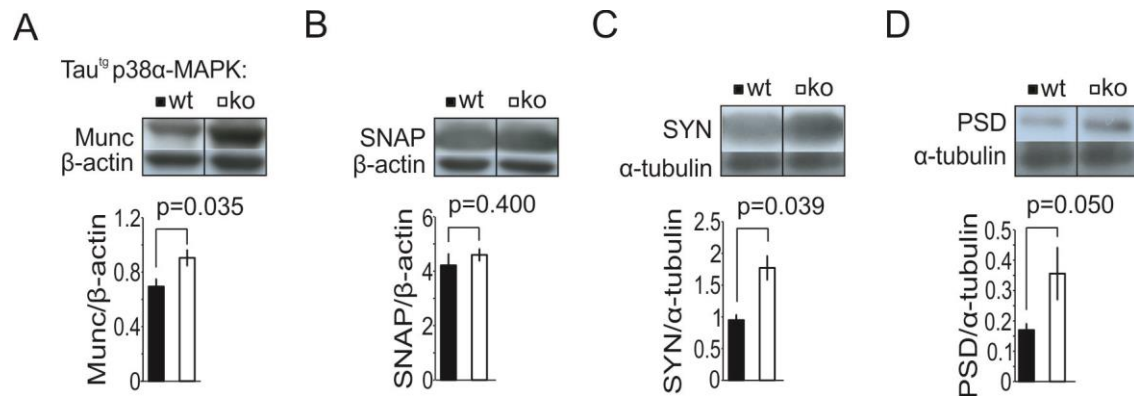


Abbildung 28: p38 α -MAPK ko erhöht synaptische Markerproteine in Tau^{tg} Mäusen. Munc, SNAP, SYN und PSD wurden in den Hirnhomogenaten mittels quantitativem *Western blot* analysiert. Dazu wurde das Proteinlevel dieser synaptische Strukturproteine mittels β -Actin bzw. α -Tubulin normalisiert und zwischen Tau^{tg} p38 α -MAPK wt und ko Geschwistern verglichen (A-D, t-Test; $n \geq 5$ pro Gruppe). A-D: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

3.20 Deletion von p38 α -MAPK reduziert Proteinmenge von pTau in Tau^{tg} Mäusen

Die p38-MAPK ist für die Phosphorylierung von Tau bekannt. Daher wurde der Effekt einer neuronalen Deletion von p38 α -MAPK auf den Phosphorylierungsstatus von Tau, in Form von pTau, in dem Tau^{tg} -Mausmodell untersucht. Dazu wurde das Maushirnhomogenat nach einem Dichtezentrifugationsprogramm in die RAB, RIPA und FA Fraktion aufgetrennt. Dabei beinhaltet vor allem die FA-Fraktion die hyperphosphorylierte, aggregierte Form von Tau. Mittels quantitativem *Western blot* der jeweiligen Fraktionen und unter Verwendung des humanen pTau Antikörpers und des humanen Tau Antikörpers, wurde das Proteinlevel von pTau, nach Normalisierung gegen Tau, zwischen den Tau^{tg} p38 α -MAPK wt und den Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen verglichen. Wie erwartet, konnte die neuronale Deletion von p38 α -MAPK die Proteinmenge des phosphorylierten Tau Proteins (pTau) verringern. In der RAB Fraktion erreichte diese Verringerung zwar keine statistische Signifikanz (Abb.29 A; t-Test $p > 0,05$), allerdings beinhaltet diese Fraktion vermutlich vermehrt die physiologische, unaggregierte Form von Tau. Zum einen wurde die pTau Intensität zwischen beiden Genoty-

pen analysiert und zum anderen das pTau Proteinlevel über das Tau Proteinlevel normalisiert. Für die RIPA und die FA Fraktion erreichte die Reduktion von pTau nach neuronaler Deletion von p38 α -MAPK nach beiden Analyseverfahren statistische Signifikanz (Abb.29 B und C; RIPA Fraktion: Reduktion der Tau Intensität um 69 % und des Verhältnisses pTau/Tau um 75 %; FA Fraktion: Reduktion der Tau Intensität um 95 % und des Verhältnisses pTau/Tau um 40 %).

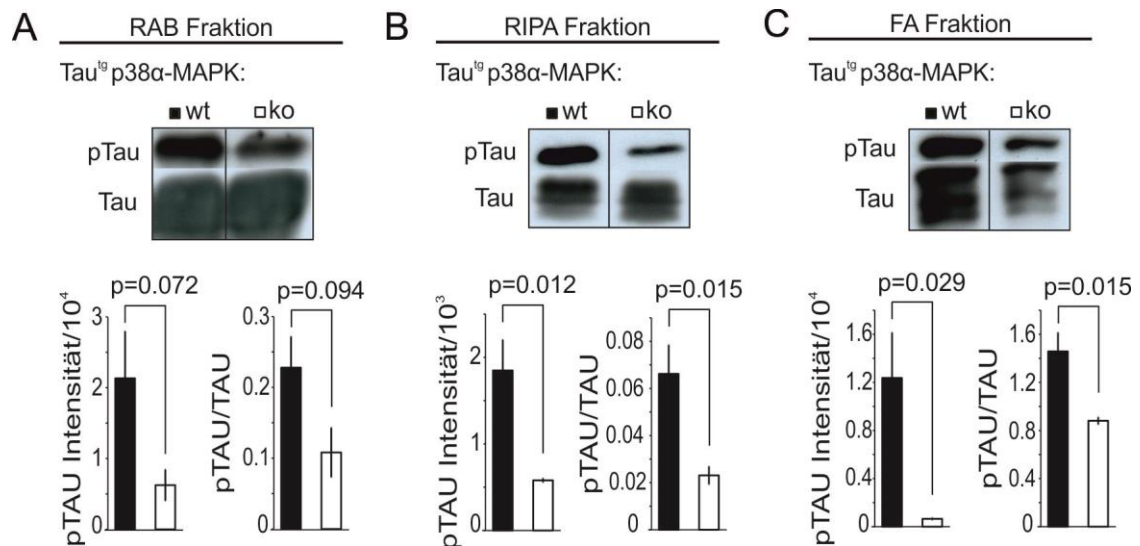


Abbildung 29: p38 α -MAPK ko reduziert Proteinlevel von pTAU in Tau^{tg} Mäusen. Die phosphorylierte Form von Tau (pTau) und Tau wurden in den Hirnhomogenaten mittels quantitativem *Western blot* nach Separation der Fraktionen RAB, RIPA und FA, analysiert. Dazu wurde das Proteinlevel von Tau unter den Tau^{tg} p38 α -MAPK wt und p38 α -MAPK ko Mäusen, sowie pTau nach Normalisierung über Tau zwischen diesen Genotypen verglichen (A-C, t-Test; $n \geq 4$ pro Gruppe). A-C: zeigen repräsentative Banden unterschiedlicher Abschnitte des jeweils gleichen Gels.

In der RIPA-Fraktion scheint das Proteinlevel an Tau zwischen beiden Genotypen vergleichbar und die Wahl der Analysemethode hat keinen Einfluss auf die Stärke der Reduktion von pTau im p38 α -MAPK ko. In der FA Fraktion hingegen ist das Level an pTau im p38 α -MAPK ko schwer nachzuweisen und auch das Proteinlevel von Tau ist gegenüber dem, der p38 α -MAPK wt Tiere stark reduziert. Da in der FA Fraktion fast nur aggregiertes, also hyperphosphoryliertes Tau vorliegt ist die Reduktion in den Tau^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen beim Vergleich der pTau Intensitäten sehr viel stärker, als wenn das pTau Proteinlevel gegen das Proteinlevel von Tau normalisiert wird.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von p38 α -MAPK in der AD-Pathogenese aufzuklären und zu überprüfen, ob die Deletion von p38 α -MAPK direkten Einfluss auf BACE nimmt und falls ja, welche Prozesse involviert sind und welche molekularen Mechanismen dabei zugrunde liegen.

4.1 Modellsysteme und Versuchsgruppen

Die Untersuchungen *in vitro* wurden in SHSY5Y Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie ist ein etabliertes neuronales Zellsystem, um spezifische Prozesse zu untersuchen. In den *in vitro* Experimenten wurde der p38-MAPK-Inhibitor SB203580 eingesetzt, der sowohl die α -als auch die β -Untereinheit hemmt. Allerdings muss beachtet werden, dass gerade die α -Untereinheit vermehrt von Neuronen exprimiert wird und daher der Effekt der β -Untereinheit wohl eher vernachlässigbar ist. Grundlage aller, die A β -vermittelte AD-Pathogenese betreffenden, durchgeführten *in vivo* Experimente waren APP/PS1^{tg} Mäuse bzw. APP/PS1^{wt} Geschwistertiere als Kontrollgruppe für die Kognitivtests, mit und ohne Deletion von p38 α -MAPK. Die Tiere dienten als Modell der AD. Untersucht wurden zwei Altersstufen. In 4 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK heterozygoten ko Tieren konnten zunächst grundlegende molekulare Prozessveränderungen festgestellt werden und in den älteren 9 Monate alten APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK homozygoten ko Mäusen zusätzlich die Kontinuität der p38 α -MAPK-induzierten Effekte, sowie das Lernverhalten und die Gedächtnisleistung überprüft werden. Dadurch ließen sich die Auswirkungen der genetischen Reduktion von p38 α -MAPK auf die AD-Pathologie analysieren. Allerdings imitieren die APP/PS1^{tg} Mäuse den Morbus Alzheimer nicht ganzheitlich. So bildeten diese Mäuse keine NFT aus (Chishti et al., 2001) und es ist keine AD typische Hirnatrophie zu beobachten. Deshalb wurde der Effekt einer genetischen p38 α -MAPK Deletion auf das zweite typische Charakteristikum, nämlich die NFTs, zusätzlich in den Tau^{tg} Mäusen untersucht. Allerdings sind das AD-Mausmodell und das Tau-Mausmodell zwei voneinander separierte Modellsysteme, die in AD-Patienten hingegen ab einem gewissen Krankheitsstadium co-existieren. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Ergebnisse auch Spezies abhängig sein können, sodass die Translation der gewonnenen Ergebnisse nur unter

Vorbehalt von einem Mausmodell auf den Menschen übertragen werden kann. Darüber hinaus gibt es aktuell ein neues AD-Mausmodell, in dem nicht das murine APP überexprimiert wird, sondern ein *knock-in* Modell, indem das humane APP unter dem murinen Promoter exprimiert wird (Saito et al., 2014). Dies ist eine bessere Annäherung an die AD-Pathogenese im Menschen und bereits erzielte Ergebnisse auf dem Gebiet der AD-Forschung werden partiell in dem neuen *knock-in* Modell verifiziert werden müssen.

4.2 Stand der Forschung und Hypothesenentwicklung

Das neurotoxische Molekül A β , welches durch sequentielle Prozessierung über β - und γ -Sekretase synthetisiert wird (Vassar et al., 2014), schädigt Neurone und induziert zerebrale Inflammation (Mucke, Selkoe, 2012; Wyss-Coray, Rogers, 2012). Mikroglial aktivierte Inflammation korreliert mit dem Voranschreiten der Krankheit in AD-Patienten (Cagnin et al., 2001a; Edison et al., 2008b). Die p38-MAPK, welche auf inflammatorische Stimuli, sowie oxidativen Stress reagiert, ist im AD-Hirn aktiviert (Hensley et al., 1999b; Sun et al., 2003a) und vermittelt die A β -induzierte Inflammation in Mikroglia kulturen (Bachstetter et al., 2011). Studien favorisieren die Hypothese, dass eine Inhibition von p38 α -MAPK die AD-Pathogenese verzögert. Zum Beispiel konnte nach oraler Applikation eines p38 α -MAPK Inhibitors die Neuroinflammation und die synaptische Dysfunktion erfolgreich in APP^{tg} Mäusen reduziert werden (Munoz et al., 2007; Alam, 2015). Allerdings blieb der Effekt von p38 α -MAPK auf die A β -Pathologie bisher unerforscht. Zahlreiche Bindungsstellen für inflammatorische und oxidative Stimuli-getriggerte Transkriptionsaktivatoren wie AP1, AP2, NF- κ B, STAT1 und SP1, wurden in der Promoter Region des bace Gens identifiziert, was vermuten lässt, dass Neuroinflammation die BACE Expression erhöhen kann (Christensen et al., 2004; Ge et al., 2004; Sastre et al., 2006; He et al., 2007). Gesteigerte BACE Proteinexpression und Aktivität wurde in Fällen mit sporadischer AD (Yang et al., 2003) und während Alterungsprozessen (Fukumoto et al., 2004) beobachtet. Die Hochregulierung von BACE führt zu erhöhter A β -Generation, was zu einem BACE-gestützten schädlichen Zyklus und der AD-Pathogenese führt (Chami, Checler, 2012). Die BACE Enzymaktivität kann durch ein proinflammatorisches Milieu verstärkt werden und die p38 α -MAPK leitet als Stresskinase die Transkription von proinflammatorischen Molekülen

ein und ist zudem im AD-Hirn stark erhöht. Daher stellt sich die Frage, ob p38 α -MAPK das Schlüsselmolekül, in dem sich selbst verstärkenden neurotoxischen A β -BACE-Zyklus, ist. Aufgrund dieser Beobachtungen formulierte sich folgende Arbeitshypothese „Die neuronale Deletion der p38 α -MAPK kann diesen toxischen *feedforward* Zyklus regulieren und dadurch die A β -induzierte AD-Pathogenese verändern“.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Diese hier vorgelegte Studie zeigt, dass eine partielle neuronale Deletion *via* heterozygotem bzw. homozygotem ko oder kd einer der Inflammations-sensitiven Kinasen, nämlich der p38 α -MAPK, die A β -Synthese und den zerebralen A β -Gehalt, durch Förderung der Makroautophagie (hier weiter als Autophagie bezeichnet) mit assoziierter BACE Degradation und durch verminderte Glykosylierung reduziert. Eine erhöhte Autophagie nach Inhibition von p38 α -MAPK wurde zwischenzeitlich durch Guo und Kollegen *in vitro* bestätigt (Guo et al., 2016). Interessanterweise ist hingegen die Genexpression von bace in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK Mäusen erhöht. Dies lässt auf einen kompensatorischen Versuch der Neurone schließen, die erhöhte BACE Degradation auszugleichen, um die physiologischen Funktionen von BACE wie beispielsweise die Myelinisierung zu erhalten. Zusätzlich begünstigt eine neuronale Reduktion von p38 α -MAPK die BACE Aktivitätsminderung, erhöht synaptische Plastizität und zerebrale Wachstumsfaktoren bei gleichzeitiger Verringerung von Apoptose und des proinflammatorischen Expressionsprofils. Der Effekt auf das BACE Proteinlevel und die Sekretasen-Aktivität ist dabei in APP/PS1^{tg} Mäusen deutlicher als in den APP/PS1^{wt} Geschwistern zu beobachten. Zudem verstärkt die Reduktion von p38 α -MAPK die Autophagie *in vitro* und *in vivo*. Nach Kontrollexperimenten in ATG5^(lox/lox) Tieren hinsichtlich des BACE Proteinlevels und der β - und γ -Sekretasen-Aktivität, konnten zunächst keine Veränderungen festgestellt werden. Allerdings werden bei der Präparation vom Gesamthirn als Zelllysat auch die nicht neuronale Zellen wie Mikroglia und Astrozyten mit in die Analysen einbezogen, welche beide p38-MAPK exprimieren. Daher wurde zusätzlich die Präparation embryonaler Neuronen durchgeführt. Dieses Modellsystem weist eine rein-neuronale Zellpopulation auf und konnte die Hypothese, dass BACE durch erhöhte Autophagie degradiert wird und folglich bei Autophagieinhibition

unverändert in der Zelle vorliegt, bestätigen. Autophagie gilt als zellulärer katabolischer Mechanismus durch welchen überschüssige oder fehlgefaltete Proteine und Organellkomponenten durch die lysosomale Maschinerie degradiert werden (Nixon, 2013). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die Autophagie in AD beeinträchtigt ist (Nixon et al., 2005; Yang et al., 2011; Peric, Annaert, 2015). Histologische Analysen zeigen eine Akkumulation von Autophagosomen und Autolysosomen in Neuronen im AD-Hirn (Boland et al., 2008). Diese Akkumulation autophagischer Vakuolen stellen potentiell Membranstrukturen bereit, um A β zu generieren. Denn BACE schneidet APP und die Komponenten der γ -Sekretase sind in autophagischen Vakuolen angehäuft (Yu et al., 2005). Eine Inhibition von p38 α -MAPK kann diese dysfunktionale Autophagie im AD-Hirn beheben und des Weiteren, ist eine erhöhte Autophagie förderlich für die Degradation von APP, sowie seinem C-terminalen Fragment C99 und von hyperphosphorylierten Tau Proteinen (Parr et al., 2012; Jo et al., 2014; Polito et al., 2014). Wie p38 α -MAPK die Autophagie reguliert ist jedoch unklar. p38-MAPK inhibiert, nach Nahrungsentzug, die Autophagie durch Eingreifen an der Bindung zwischen ATG9 und dem p38 Interaktionsprotein in HEK293 Zellen (Webber, Tooze, 2010) und durch Phosphorylierung von ATG5 in Fibroblasten und Makrophagen (Keil et al., 2013b). Des Weiteren vermittelt p38-MAPK die durch Interferon- γ oder oxidativen Stress ausgelöste Autophagie in Makrophagen und Hela Zellen (Matsuzawa et al., 2012; Zhong et al., 2014). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt von p38 α -MAPK auf die Autophagie Zelltyp-spezifisch ist und zusätzlich von dem Stimuli selbst abhängt. In dem hier etablierten neuronalen Zellmodell scheint die Inhibition von p38 α -MAPK jedoch die Degradation von BACE in den Lysosomen in Abhängigkeit von ATG5 zu beschleunigen. Mittels immunhistochemischer Färbung konnte nur eine schwache Co-Lokalisation von BACE, mit autophagischen Vakuolen nachgewiesen werden. Allerdings könnte dies auf eine Degradation des Epitops von BACE zurückzuführen sein, wodurch im Abbauprozess von BACE dieses nicht mehr über Epitop-Antikörperbindung detektierbar ist. Konsequenterweise müssen Fragen, welche sich auf den BACE Transport zu den Autophagievakuolen unter Reduktion von p38 α -MAPK beziehen, gestellt werden. Für den Transport von BACE zur lysosomalen Degradation muss BACE durch seine zugehörigen

Adapterproteine wie GGA1 und GGA3, welche im AD-Hirn vermindert vorliegen co-transportiert werden (Bonifacino, Traub, 2003; Kang et al., 2010; Tan, Evin, 2012). BACE weist ein saures Dieleucinmotiv (DXXLL) am C-Terminus auf. Dieses bindet die VHS Domäne der Adapterproteine. Diese Bindung wird durch Phosphorylierung an Serin 498 in dem DXX(S)LL-Motiv verstärkt (Walter et al., 2001; Kato et al., 2002). Allerdings verändert der kd von p38 α -MAPK nicht die Phosphorylierung von BACE, daher sollte in zukünftigen Experimenten geklärt werden, ob eine p38 α -MAPK Defizienz die Phosphorylierung von GGA1 oder GGA3 und dadurch die GGA1 bzw. GGA3-vermittelte Degradation von BACE beeinflusst. Vorzüge die Autophagie indirekt, wie beispielsweise durch neuronale Deletion von p38 α -MAPK, zu fördern bestehen darin, dass das Autophagie-Lysosomen-System seine normale physiologische Form aufrechterhalten kann. In einem AD-Mausmodell mit A β -Pathologie, konnte durch Erhöhen der lysosomalen Autophagie der A β -induzierte Phänotyp behoben werden (Yang et al., 2011; Shoji-Kawata et al., 2013). Aktuelle Studien von Feng und Kollegen (Feng et al., 2017) an corticalen wt Neuronen zeigen, dass nach Induktion von Autophagie die Rekrutierung von BACE zum autophagischen Signalweg hin begünstigt wurde und der retrograde Transport von BACE von distalen Axonen wurde verstärkt. Im Gegensatz zu unserer Studie konnte dieser Effekt nicht im AD Modell nachgeahmt werden. In Neuronen, die das humane APP exprimieren, war der Autophagie-induzierte BACE Abbau weitestgehend unterdrückt. Wurde in diesen mutierten Neuronen Autophagie eingeleitet, wurde BACE in autophagischen Vakuolen in distalen Axonen zurückgehalten und die Synthese von C99 begünstigt. Feng und Kollegen konnten den Defekt des retrograden Transports in APP Neuronen durch Überexpression von Snapin beheben. Dadurch wurde BACE wieder per retrogradem Transport in den autophagischen Vakuolen zu den Lysosomen im Zellsoma dirigiert und dort abgebaut. Snapin ist an dem intrazellulären Transport von Proteinen von den späten Endosomen zu Lysosomen beteiligt und Phosphorylierung von Snapin durch die Leucin-reiche Kinase 2 kann die Interaktion von Snapin und SNAP25 bei der Vesikelfusion inhibieren (Yun et al., 2013). Dabei wird Snapin nach Phosphorylierung ein inaktiver Proteinstatus zugewiesen. Literatur Recherche mit dem NetPhosK 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) belegte, dass Snapin theo-

retisch an verschiedenen Theronin- und Serin-Stellen durch p38-MAPK phosphoryliert werden kann. Analysen mittels des Hefe-2-Hybrid –Systems belegen sogar eine direkte Interaktion zwischen p38-MAPK und Snapin (Wang et al., 2008). Daher könnte davon ausgegangen werden, dass p38 α -MAPK Snapin in AD-Mäusen phosphoryliert, wodurch der retrograde Transport gehemmt wird. BACE kann nun in den autophagischen Vakuolen akkumulieren und kann auf genügend Membrankomponenten zurückgreifen um APP zu C99 zu prozessieren. In den AD-Mäusen mit neuronaler Deletion von p38 α -MAPK, wird Snapin vermutlich deutlich weniger phosphoryliert. Das unphosphorylierte, also aktive Snapin kann nun den retrograden Transport von BACE von distalen Axonen zu den Lysosomen im Zellsoma hin verstärken, wo BACE degradiert und der toxische Zyklus zwischen BACE Aktivität und A β schließlich unterbrochen wird. Neben der Autophagie selbst, zeigen Studien von Kizuka und Kollegen, dass eine post-translationale Veränderung an BACE durch MGAT3-Glykosylierung den lysosomalen Abbau von BACE begünstigt (Kizuka et al., 2015a; Kizuka et al., 2015b; Kizuka et al., 2016). In dieser hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass p38 α -MAPK diese Glykosyltransferase MGAT3 phosphoryliert und dadurch indirekt den BACE Glykosylierungsstand beeinflusst. In zukünftigen Experimenten soll in Kooperation mit Kizuka und Kollegen in BACE pull down Lysaten von p38 α -MAPK kd-ct, kd709 und kd509 die N-Glykane zusätzlich per Massenspektrometrie analysiert werden. Andere Studien an Neuro2a Zellen zeigen, unter Glukose Beschränkung, ebenfalls einen Zusammenhang von p38-MAPK und einer anderen Glykosyltransferase (Cheung, Hart, 2008). Dabei scheint p38-MAPK über sein C-terminales Ende mit dem Enzym zu interagieren und es zu spezifischen Zielproteinen zu dirigieren. In diesem Fall wird das Glykoprotein zu dem Neurofilament H transportiert, welches unter Zuckerentzug glykosyliert wird. Interessanterweise, ist dabei eine erhöhte Löslichkeit der Neurofilamente zu beobachten, was in einer Instabilisierung des neuronalen Zytoskellets führen kann. In AD ist der zerebrale Glukosespiegel signifikant verringert (Frackowiak et al., 1981; Yamaguchi et al., 1997) und eine permanente Instabilisierung der Axone könnte zusätzlich zu der sinkenden Neuronendichte führen. p38-MAPK ist also bei vermindertem Glukosespiegel aktiv

und könnte theoretisch über Interaktion mit beiden Glykosyltransferasen zu der AD-Pathologie beitragen.

Eine Defizienz an bestimmten Molekülen des angeborenen Immunsystems wie CD14, TLR2, TLR4, MyD88, IRAK4, IKK β und TREM2 mildert in APP^{tg} Mäusen die Neuroinflammation und verlagert die mikrogliale Aktivierung von pro-inflammatorischen zu anti-inflammatorischen Signalwegen. Dies wird wiederum mit einer Reduktion des zerebralen A β -Gehalts und verbesserten kognitiven Funktionen in AD Mäusen assoziiert (Walter et al., 2007; Hao et al., 2011; Lim et al., 2011; Cameron et al., 2012; Liu et al., 2012; Liu et al., 2014; Jay et al., 2015). Dieser Effekt der verminderten A β -Synthese und der gemilderten kognitiven Defizite, kann wie in dieser Studie gezeigt, ebenfalls durch Reduktion von p38 α -MAPK evoziert werden. Denn zum einen ist die p38-MAPK dem Signalweg der genannten Moleküle und den entsprechenden Transkriptionsfaktoren zwischengeschaltet und zum anderen reduziert eine Defizienz von p38-MAPK die Synthese von A β welche wiederum neue Mikroglia aktivieren können. Zusätzlich zeigen Genexpressionsanalysen nach p38 α -MAPK ko neben erhöhten Wachstumsfaktoren wie BDNF und IGF1, eine Reduktion der Mikroglia und pro-inflammatorischen Molekülen. Aktuell zeigten Wu und Kollegen, dass zumindest in mikroglialen Primärkulturen, lediglich das p38 α Isoform und nicht β an der Stimulation der Sezernierung von TNF- α , IL1 β und IL6 beteiligt ist (Wu et al., 2017). Zudem zeigt diese Studie, dass mikrogliale p38 β -MAPK im Gegensatz zu p38 α -MAPK von großer Bedeutung für die CREB Phosphorylierung ist. Bei Übertragung dieser Ergebnisse auf Neuronen könnte dies erklären, warum CREB, obwohl als p38-MAPK Substrat bekannt, nach Deletion von p38 α -MAPK keine Änderungen im Phosphorylierungslevel aufweist und die befürchteten Nebeneffekte glücklicherweise ausbleiben. Bei AD und anderen neurodegenerativen Krankheiten wie der Parkinsonkrankheit ist das Proteinlevel von BDNF signifikant vermindert (Phillips et al., 1991; Narisawa-Saito et al., 1996). Interessanterweise stellen Forschungsergebnisse von Murer und Kollegen einen Zusammenhang zwischen BDNF-Abstinenz in Neuronen mit hyperphosphoryliertem Tau her (Murer et al., 1999). Ein ko von p38 α -MAPK verringert die Bildung von NFT und erhöht gleichzeitig das BDNF-Level in gesunden Neuronen. Insgesamt ist die synaptische Plastizität nach neuronalem ko von p38 α -MAPK

in den APP/PS1^{tg} und in den Tau^{tg} Mäusen deutlich verbessert. Denn nicht nur die synaptischen Markerproteine sind erhöht, sondern auch die kognitiven Leistungen sind signifikant verbessert. Die Gedächtnisleistung korreliert stark mit Veränderungen der synaptischen Funktion, welche durch elektrophysiologische Messungen quantifiziert werden kann. Eine, wie bei der AD vorkommende, verminderte Langzeitpotentierung (LTP) ist mit verschlechterter synaptischen Plastizität, sowie Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert (zusammengefasst in (Yan et al., 2016)) und A β verstärkt zudem die Langzeitdepression (LTD). Dabei wurde bereits gezeigt, dass eine p38-MAPK Inhibition die A β -induzierte verstärkte LTD aufhebt (Chen et al., 2013). Da BDNF auch bei der Regulierung der LTP, also der Aktionspotentialverstärkung an der Synapse, beteiligt ist (Korte et al., 1995) und bei stark erhöhtem Level, über die physiologische Norm hinaus, unter Verdacht steht Epilepsie zu fördern (zusammengefasst in (Binder et al., 2001)) wäre es von großem Interesse elektrophysiologische Messungen in hippocampalen Schnitten von APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK Mäusen durchzuführen. Dadurch könnten Verschiebungen der synaptischen Ströme in einem Bereich der Hyperaktivität als potentiell Risiko einer p38 α -MAPK Reduktion vorhergesagt oder vermutlich, da die Tiere keine Anzeichen von Epilepsie aufweisen, ausgeschlossen und die verbesserte Gedächtnisleistung im *Morris water maze* bestätigt werden. Neben BDNF ist auch IGF1 erhöht. Wird gealterten Ratten IGF1 appliziert, sinkt das zerebrale A β -Level (Carro et al., 2002). Dieser Effekt scheint durch TNF- α aufgehoben zu werden, sodass A β wieder akkumuliert. Des Weiteren reguliert IGF1 die Phosphorylierung von Tau in *vitro* (Hong, Lee, 1997) und in *vivo* (Schubert et al., 2003), wobei es die Bindungsaffinität von Tau zu den Mikrotubuli stärkt. Durch den ko von p38 α -MAPK steigert sich also das zerebrale Expressionslevel von IGF1, welches wiederum wie der ko von p38 α -MAPK selbst, beide pathogene Schlüsselmoleküle der AD positiv beeinflusst. Der Phänotyp der APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäusen entspricht aufgrund des erhöhten A β -Gehalts, der erhöhten β -Sekretasen-Aktivität und der schlechten kognitiven Gedächtnisleistung, dem von AD-Patienten. Ebenso korrelieren die erhöhten Expressionsprofile der proinflammatorischen Moleküle wie TNF- α , IL1- β , und NOS2 der APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäusen mit der aus der Literatur geschilderten AD-Pathogenese (Heneka et al., 2001; Colangelo et al., 2002;

Bonotis et al., 2008), wobei für IL1- β keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Wie bereits in Abb. 6 dargestellt, kann A β die Mikroglia aktivieren. Diese sezernieren unter anderem TNF- α und IL1- β , wodurch über p38-MAPK die neuronale Apoptose eingeleitet wird. Die Menge von NOS2 korreliert mit dem A β -Gehalt in AD-Mäusen und Patienten (Kummer et al., 2011). CCL2 wird nach A β -Stimulation der Mikroglia produziert (El Khoury et al., 2003), daher wäre mit einem signifikant erhöhten Expressionslevel in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäusen zu rechnen gewesen. Da sich die p38 α -MAPK Reduktion auf Neurone beschränkt und durchaus A β -Plaques in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen vorzuweisen sind, scheint der neuronale Effekt nicht auszureichen, um CCL2 signifikant zu senken. Deshalb sollten die mikroglialen Effekte von p38-MAPK auf die A β -Pathologie ebenfalls untersucht werden. Arc ist im AD-Hirn ebenfalls stark exprimiert und soll die γ -Sekretase zu den Endosomen dirigieren, wo schließlich C99 in A β prozessiert wird (Wu et al., 2011). Liegt also in den APP/PS1^{tg} p38 α -MAPK wt Mäusen ein erhöhtes A β -Level vor, ist es möglich, dass mehr Arc exprimiert wird, um den Transport der γ -Sekretase zu den frühen Endosomen zu gewährleisten. All diese Signalkaskaden scheinen sich über mehrere Wege gegenseitig zu beeinflussen, wobei p38-MAPK als gemeinsamer Regulator zu fungieren scheint. Neben dem Zusammenhang zwischen A β und Mikroglia, zeigen aktuelle Studien auch eine positive Korrelation zwischen Tau und Mikroglia. Mikroglia sind bei einem Vorgang der Tau *spreading and seeding* bezeichnet wird, also der Verbreitung von hyperphosphoryliertem Tau im Hirn, direkt beteiligt. Aktivierte Mikroglia internalisieren Tau (Bolos et al., 2015) und sind dadurch Modulatoren der AD-Pathogenese (Maphis et al., 2015). Im Gegensatz unterbricht eine mikrogliale Deletion und Inhibition von Exosomen das Tau *spreading* (Asai et al., 2015). Ob protektive oder schädliche Eigenschaften der Mikroglia überwiegen ist bis dato ungeklärt. Zusammenfassend allerdings verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die Mikroglia selbst, welche die Neuroinflammation und Pathogenese in AD beeinflussen können, stark durch die p38 α -MAPK in ihrer Aktivität moduliert werden.

4.4 Fazit und Ausblick

Studien mit BACE *knock-out* Mäusen (Luo, 2003; Ohno et al., 2004; Laird et al., 2005; Ohno et al., 2006; Mcconlogue et al., 2007; Ohno et al., 2007; May et al., 2011) oder pharmakologische Inhibition von BACE (Filser et al., 2015) reduzieren den zerebralen A β -Gehalt und vermindern Defizite in Kognition und synaptischer Dichte in AD-Mäusen. Deshalb gilt die Inhibition von BACE als zulässige therapeutische Strategie, um den zerebralen A β Gehalt zu senken. Unglücklicherweise haben diese Studien bis heute zu keinen sicheren und erfolgreichen Behandlungsoptionen geführt. Zudem hat die Behandlung von 5xFAD Mäusen, einem Mausmodell der familiären AD, mit dem BACE-Inhibitor GRL-8234 zu unterschiedlichen Krankheitszeitpunkten (4 vs. 10 Monate) demonstriert, dass der Zeitpunkt der BACE Inhibition von enormer Bedeutung für den Therapieerfolg ist (Devi, Ohno, 2015). Wurde BACE in einem frühen Krankheitsstadium inhibiert, konnte der zerebrale A β -Gehalt reduziert und die Gedächtnisleitungen verbessert werden. Hingegen zeigte eine spätere BACE Inhibition in 10 Monate alten Mäusen keinen Einfluss auf den Krankheitszustand. Deshalb sollte für einen effektiven Therapieerfolg die Inhibition von BACE sehr früh, also eher mit präventivem als therapeutischen Charakter eingesetzt werden. Werden BACE Inhibitoren allerdings im präklinischen AD-Stadium eingesetzt und dadurch die A β Konzentration womöglich unter das physiologische Level gesenkt, kann durch diese Art von „Über-Inhibition“ eine verminderte Gedächtnisleistung, wie in BACE^{-/-} Mäusen gezeigt, auftreten (Ohno et al., 2004). Die Balance zwischen Effektivität und Sicherheit scheint bei einer direkten BACE Inhibition nicht gewährleistet. Aktuell wurde der Misserfolg eines BACE Inhibitors mit dem Namen Verubecestat (entwickelt und getestet durch die Firma Merck) bei Behandlung von milder Verlaufsform der AD nach Eintreten in die klinische Testphase II/III bekannt. Neben der späten Behandlung mit diesen Inhibitoren, ist vermutlich die komplexe physiologische Funktion von BACE ein weiterer Grund für das Scheitern dieser Therapie-Ansätze. Zwar existieren bereits weitere direkte BACE Inhibitoren, diese zeigen in der AD-Therapie bisher allerdings keine überzeugenden Erfolge. BACE hat neben APP mehr als 30 andere identifizierte Substrate, die an neuronalen Prozessen beteiligt sind (Kuhn et al., 2012), was bei direkter BACE Hemmung das Auftreten von Nebeneffekten sehr wahr-

scheinlich werden lässt. Depigmentierung des Fells nach pharmakologischer Inhibition von BACE1 und 2 (Shimshek et al., 2016), pathologische Veränderungen der Retinaschicht (Cai et al., 2012), kognitive Defizite und schizophre- nes Verhalten mit einhergehenden Krämpfen (Dominguez et al., 2005; Hitt et al., 2010; Hu et al., 2010), sowie Verschlechterung in koordinierten Bewe- gungsabläufen durch eine Reduktion der Muskelspindeln (Cheret et al., 2013) wurden bereits in BACE homozygoten ko Mäusen festgestellt. Diese Beobach- tungen machen alternative Therapieansätze der indirekten BACE-Hemmung, wie etwa über Inhibition der p38 α -MAPK, unabdingbar. Bereits andere Arbeits- gruppen befassen sich mit dieser neuen AD-Therapiestrategie und Roy und Kollegen haben einen neuen p38 α -MAPK Inhibitor mit dem Namen MW01-18- 150SRM entwickelt und nach Injektion, in zwei A β -basierten AD-Mausmodelle eine verbesserte kognitive Funktion festgestellt (Roy et al., 2015). MW01-18- 150SRM scheint die Problematik der bisherigen Kinaseninhibitoren, nämlich die Unspezifität gegenüber den Isoformen und eine wenig effektiven Inhibition der p38-MAPK im Hirn, zu überwinden und auch Studien im Tau-Mausmodell zei- gen nach Applikation des p38 α -spezifischen-MAPK Inhibitors eine Reduktion in Tau Phosphorylierung und IL-1 β -Gehalt, sowie einer Verbesserung des Ar- beitsgedächtnisses (Maphis et al., 2016). Obgleich in dieser zitierten und der hier vorgestellten Studie keine schädlichen Nebeneffekte nach neuronaler Dele- tion bzw. pharmakologischer Inhibition von p38 α -MAPK in dem AD- Mausmodellen festgestellt werden konnten, sollte unbedingt beachtet werden, dass p38 α -MAPK ebenfalls in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen, einschließlich der Inflammationsvermittlung, Tumorentstehung, Zellzyklus, Zell- tod, und Zelldifferenzierung beteiligt ist (Zarubin, Han, 2005). Mögliche toxische Nebeneffekte der p38-MAPK Inhibitoren sollten also vorsichtig ermittelt werden. Neue humane Forschungen arbeiten mit VX-754, einem für p38 α -MAPK spezi- fischen Inhibitor, der bereits in der klinischen Phase 2 getestet wird (NCT02423122 und NCT02423200). Dabei wird den Testpersonen der p38- MAPK Inhibitor zweimal täglich über eine Zeitdauer von 12 Wochen oral verab- reicht und der Effekt auf A β -Gehalt und kognitive Funktion evaluiert. Von gro- ßem Interesse ist es, die klinischen Ergebnisse dieses Inhibitors nach Anwen- dung in den AD-Patienten zu verfolgen. Der Vorteil einer indirekten BACE

Hemmung über Inhibition von p38 α -MAPK, anstatt der Anwendung direkter BACE Inhibitoren, könnte in der Wirkungsspezifität der p38-MAPK α -Untereinheit auf genannte zelluläre Mechanismen, wie Autophagie und BACE-Degradation sowie Aktivierung von Mikroglia liegen. Obwohl die p38-MAPK, ebenfalls wie BACE, eine große Bandbreite an physiologischen Substraten aufweist, könnte die Deletion der α -Untereinheit in ihren physiologischen Funktionen durch die β -Untereinheit oder die anderen Familienmitglieder der MAPK Familie, der ERKs oder JNKs kompensiert werden, sodass weniger Nebeneffekt nach Inhibition von p38 α -MAPK als bei Inhibition von BACE zu erwarten sind. Andere Forschungen berichten, dass p38-MAPK Mikroglia aktiviert und durch Begünstigung der A β Internalisierung durch Mikroglia sich positiv auf die AD Pathogenese auswirkt (Lee et al., 2014). In neurodegenerativen Krankheiten können Mikroglia pathogene als auch protektive Funktionen übernehmen. Zum Beispiel kommt es durch A β -Plaques zu einer Aktivierung der Mikroglia (Weninger, Yankner, 2001; Garden, La Spada, 2012). Nun schütten diese proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β aus und initiieren so die Neurotoxizität. Aktivierung durch den transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β 1 oder durch A β -Impfung leitet den protektiven Signalweg der Mikroglia ein. Diese werden nun phagozytotisch aktiv, bauen A β ab und wirken so neuroprotektiv (zusammengefasst in (Schafer, Stevens, 2015)). Allerdings konnte in dieser vorliegenden Studie nach der reduzierten Anzahl von Mikroglia in Mäusen mit Defizienz an neuronaler p38 α -MAPK nur begünstigende Effekte, wie eine reduziertes proinflammatorisches Zytokinmilieu detektiert werden. Welcher Effekt eine mikrogliale Deletion von p38 α -MAPK auslösen würde, ist bisher unbekannt und soll in zukünftigen Experimenten mit APP/PS1^{tg} p38 Lysz-Cre Mäusen, die eine Deletion für p38 α -MAPK in Mikroglia aufweisen, untersucht werden. Nichts desto trotz solle in Betracht gezogen werden, dass eine gehemmte Neuroinflammation ebenfalls zu Nebeneffekten führen kann. Andere Bedenken bezüglich der p38-MAPK Inhibition formieren sich auf Grund folgender Beobachtungen, erhöhte Letalität in p38 α -MAPK^{-/-} Mäusen auf Grund der Rolle von p38 α -MAPK in Organentwicklung (Adams et al., 2000), oder der erhöhten Leberwerte und Hautausschlag in klinischen Studien an Patienten mit rheumatischer Arthritis (Goldstein et al., 2010). Generell sind die bisherigen Daten von klinischen

Studien mit p38 α -MAPK Inhibitoren in chronisch entzündlichen Krankheiten nicht sehr erfolgreich, denn mildernde Effekte konnten lediglich in einer initialen Behandlungsphase festgestellt werden. Vermutlich wurde nach längerer Zeit die Signalkaskade der Inflammation durch andere Signalwege kompensiert. Deswegen ungeachtet, ist die Behandlung von AD-Patienten mit p38-MAPK Inhibitoren weiterhin vielversprechend, da die Effekte der erhöhten Autophagie und parallel dazu die verstärkte BACE Degradation spezifischer ausgerichtet sind und es sehr unwahrscheinlich ist, dass diese Effekte durch andere Signalkaskaden kompensiert werden. Dass Neurone und Mikroglia an der AD-Pathogenese beteiligt sind, ist unumstritten und auch die Astroglia scheinen dabei eine Rolle zu übernehmen. Vor allem um vaskuläre A β -Ablagerungen im AD-Hirn wurden vermehrt Astroglia detektiert (Verkhatsky et al., 2010) welche A β aufnehmen (Nagele et al., 2003) und der Grad der Astrogliose korreliert mit kognitiven Defiziten (Simpson et al., 2010). Daher wäre es für zukünftige Experimente im AD-Mausmodell zusätzlich von Bedeutung, die Effekte von p38 α -MAPK in den jeweils unterschiedlichen Zelltypen auf die AD-Pathogenese zu untersuchen. Denn neben der neuronalen Expression von p38 α -MAPK, können auch andere Zelltypen wie Mikroglia und Astrozyten p38 α -MAPK exprimieren (siehe Abb.30, modifiziert nach (Munoz, Ammit, 2010)) und dadurch Inflammation und synaptische Toxizität beeinflussen. Die neuronalen Effekte von p38 α -MAPK konnten in dieser Studie *in vitro* und *in vivo* untersucht und die bisherigen Forschungsergebnisse entsprechend ergänzt werden (rote Umrandung und Pfeilführung in Abb.30). Zusammengefasst konnte diese Arbeit zeigen, dass die Inhibition von p38 α -MAPK in Neuronen, die Autophagie verstärkt und BACE Degradation erleichtert. Dadurch wird wiederum die neuronale A β -Synthese und der zerebrale A β -Gehalt reduziert. Des Weiteren wird MGAT3, welche über Glykosylierung für die BACE-Stabilität verantwortlich ist, durch p38 α -MAPK phosphoryliert und dadurch in seiner Enzymaktivität beeinflusst. Daher besteht in der Inhibition von p38 α -MAPK ein ganzheitlicher Ansatz um den A β -Gehalt durch 1) erhöhte Autophagie und 2) Minderung der BACE Aktivität durch Inhibition der MAGT3-vermittelten Glykosylierung von BACE, zu senken und darüber hinaus die synaptische Toxizität durch 1) reduzierte Hyperphosphorylierung von Tau und 2) verminderte pro-inflammatorische Sezernierung von Zytokinen durch Mikroglia

zu senken. Deshalb ist p38 α -MAPK ein potentiell vielversprechendes Ziel für zukünftige AD-Therapie. Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Zelltypen und deren Expressionseffekt von p38 α -MAPK bleiben allerdings bisher unerforscht. Ob ein paralleler ko von p38 α -MAPK beispielsweise in Mikroglia und Neuronen möglich ist, um die AD-Pathogenese beispielsweise durch eine zusätzlich verringerte Exitoxizität zusätzlich zu verbessern, oder ob gerade dann die toxischen Nebeneffekte initiiert werden, sollte in zusätzlichen Experimenten untersucht werden. Denn auch hier stellt sich die Frage, wie weit man die Aktivität eines physiologisch bedeutenden Proteins wie der p38-MAPK senken kann, um bei minimalen Nebeneffekten einen maximalen Effekt auf die AD-Pathogenese zu erzielen.

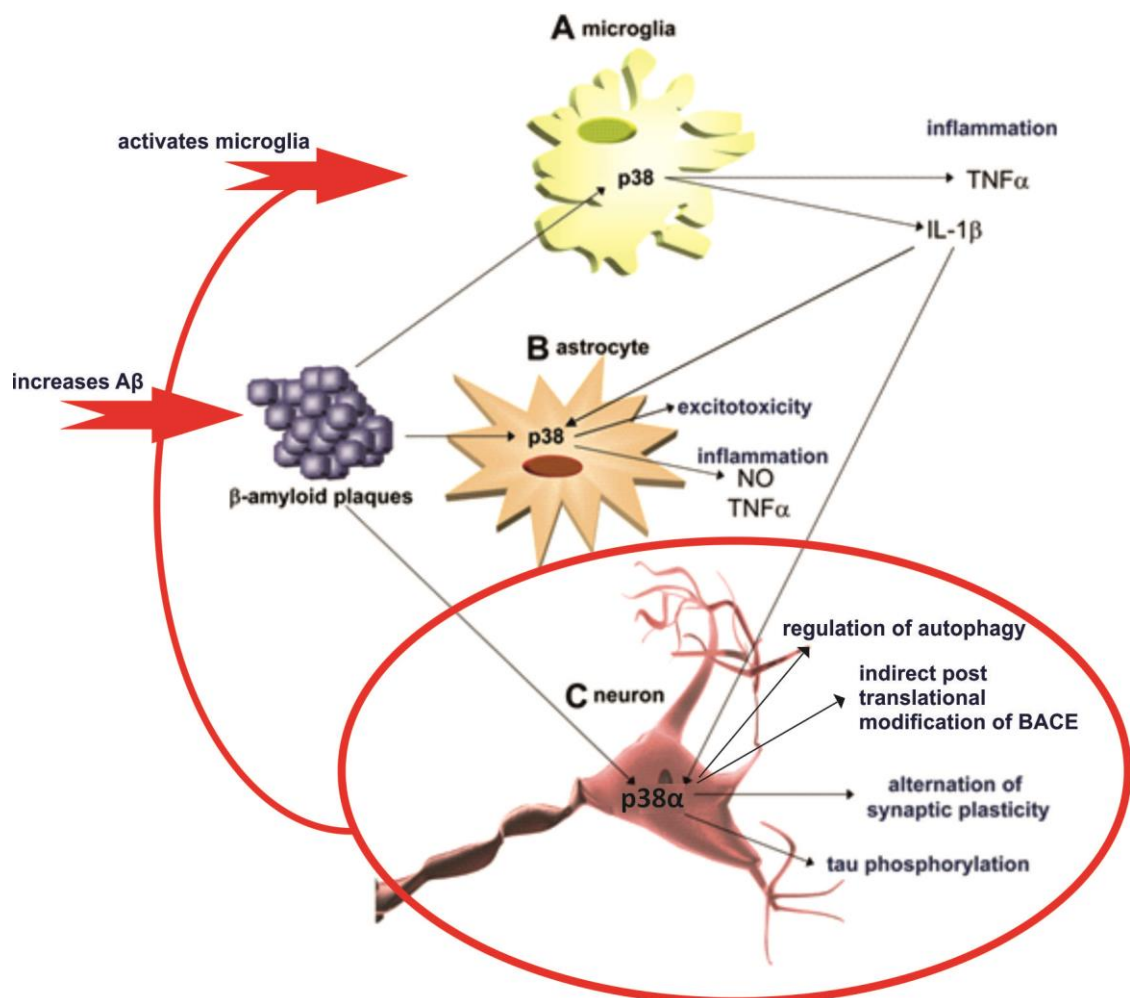


Abbildung 30: Fokus der Forschung ist die Aufklärung der pathogenen Rolle der neuronalen p38 α im AD-Mausmodell (modifiziert nach (Munoz, Ammit, 2010)). p38 wird von A: Mikroglia, B: Astroglia und von C: Neuronen exprimiert und löste nach A β -induzierter Aktivierung je nach Zelltyp unterschiedliche Reaktionen aus.

5 Literaturverzeichnis

1. Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, Valladares A, Perez L, Klein R, Nebreda AR (2000) Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Molecular cell* 6:109-116
2. Alam JJ (2015) Selective Brain-Targeted Antagonism of p38 MAPK α Reduces Hippocampal IL-1 β Levels and Improves Morris Water Maze Performance in Aged Rats. *J Alzheimers Dis* 48:219-227
3. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia* 7:270-279
4. Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6923-6928
5. Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783-787
6. Alonso Adel C, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004) Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* 279:34873-34881
7. Alzheimer A (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 4:356-385
8. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kugler S, Ikezu T (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 18:1584-1593
9. Association As (2015) 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 11:332
10. Bachstetter AD, Xing B, de Almeida L, Dimayuga ER, Watterson DM, Van Eldik LJ (2011) Microglial p38 α MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (A β). *J Neuroinflammation* 8:79
11. Badger AM, Cook MN, Lark MW, Newman-Tarr TM, Swift BA, Nelson AH, Barone FC, Kumar S (1998) SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *The Journal of Immunology* 161:467-473
12. Bagrodia S, Dérijard B, Davis RJ, Cerione RA (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* 270:27995-27998
13. Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ (1997) Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature genetics* 17:263-264
14. Barnes DE, Yaffe K (2011) The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10:819-828
15. Bartus RT, Dean Rr, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-414
16. Benjannet S, Elagoz A, Wickham L, Mamrnbachi M, Munzer JS, Basak A, Lazure C, Cromlish JA, Sisodia S, Checler F, Chretien M, Seidah NG (2001) Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain

- shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J Biol Chem* 276:10879-10887
17. Bennett BD, Denis P, Haniu M, Teplow DB, Kahn S, Louis J-C, Citron M, Vassar R (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's β -secretase. *Journal of Biological Chemistry* 275:37712-37717
18. Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT (2010) Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68:19-31
19. Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends in neurosciences* 24:47-53
20. Bird TD (2008) Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 10:231-239
21. Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Sturchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P (2002) Expression of human β -secretase in the mouse brain increases the steady-state level of β -amyloid. *Journal of neurochemistry* 80:799-806
22. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:6926-6937
23. Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME (2008) Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *The Journal of neuroscience* 28:4283-4292
24. Bolos M, Llorens-Martin M, Jurado-Arjona J, Hernandez F, Rabano A, Avila J (2015) Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo. *J Alzheimers Dis* 50:77-87
25. Bonifacino JS, Traub LM (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72:395-447
26. Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S (2008) Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *Journal of neuroimmunology* 193:183-187
27. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radzilejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675
28. Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49:671-682
29. Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463
30. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB (2001a) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358:461-467
31. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB (2001b) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *The Lancet* 358:461-467
32. Cai J, Qi X, Kociok N, Skosyrski S, Emilio A, Ruan Q, Han S, Liu L, Chen Z, Rickman CB (2012) β -Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO molecular medicine* 4:980-991
33. Cameron B, Tse W, Lamb R, Li X, Lamb BT, Landreth GE (2012) Loss of interleukin receptor-associated kinase 4 signaling suppresses amyloid pathology and alters microglial phenotype in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience* 32:15112-15123

34. Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, Boschert U, Arkinstall S (1998) Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280:1262-1265
35. Capell A, Steiner H, Willem M, Kaiser H, Meyer C, Walter J, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of β -secretase. *Journal of Biological Chemistry* 275:30849-30854
36. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels. *Nature medicine* 8:1390-1397
37. Casley C, Land J, Sharpe M, Clark J, Duchen M, Canevari L (2002) β -Amyloid fragment 25–35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiology of disease* 10:258-267
38. Chami L, Checler F (2012) BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7:52
39. Chen X, Lin R, Chang L, Xu S, Wei X, Zhang J, Wang C, Anwyl R, Wang Q (2013) Enhancement of long-term depression by soluble amyloid β protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38MAPK, STEP and caspase-3. *Neuroscience* 253:435-443
40. Cheret C, Willem M, Fricker FR, Wende H, Wulf-Goldenberg A, Tahirovic S, Nave KA, Saftig P, Haass C, Garratt AN (2013) Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *The EMBO journal* 32:2015-2028
41. Cheung WD, Hart GW (2008) AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *J Biol Chem* 283:13009-13020
42. Chishti MA, Yang D-S, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *Journal of Biological Chemistry* 276:21562-21570
43. Christensen MA, Zhou W, Qing H, Lehman A, Philipsen S, Song W (2004) Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol* 24:865-874
44. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K (1996) The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *Journal of Biological Chemistry* 271:6497-6501
45. Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ (2002) Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 70:462-473
46. Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses AD, Haines J, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923
47. Crouch PJ, Blake R, Duce JA, Ciccotosto GD, Li Q-X, Barnham KJ, Curtain CC, Cherny RA, Cappai R, Dyrks T (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1-42. *The Journal of neuroscience* 25:672-679
48. Crouch PJ, Harding S-ME, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL (2008) Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:181-198
49. Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429:403-417

50. D'Aversa TG, Weidenheim KM, Berman JW (2002) CD40-CD40L interactions induce chemokine expression by human microglia: implications for human immunodeficiency virus encephalitis and multiple sclerosis. *The American journal of pathology* 160:559-567
51. De Strooper B, Annaert W (2010) Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:235-260
52. De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 6:99-107
53. Devi L, Ohno M (2015) Effects of BACE1 haploinsufficiency on APP processing and A β concentrations in male and female 5XFAD Alzheimer mice at different disease stages. *Neuroscience* 307:128-137
54. Di Marco LY, Marzo A, Munoz-Ruiz M, Ikram MA, Kivipelto M, Ruefenacht D, Venneri A, Soininen H, Wanke I, Ventikos YA, Frangi AF (2014) Modifiable lifestyle factors in dementia: a systematic review of longitudinal observational cohort studies. *J Alzheimers Dis* 42:119-135
55. Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 280:30797-30806
56. Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow E, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *The EMBO journal* 11:2131
57. Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *The Journal of cell biology* 103:2739-2746
58. Du Yan S, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T (1997) An intracellular protein that binds amyloid- β peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 389:689-695
59. Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A (2008a) Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R) PK11195-PET and [11C] PIB-PET study. *Neurobiology of disease* 32:412-419
60. Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ (2008b) Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis* 32:412-419
61. Eikelenboom P, Stam F (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. *Acta neuropathologica* 57:239-242
62. El Khoury JB, Moore KJ, Means TK, Leung J, Terada K, Toft M, Freeman MW, Luster AD (2003) CD36 mediates the innate host response to β -amyloid. *The Journal of experimental medicine* 197:1657-1666
63. Esterhazy D, Stützer I, Wang H, Rechsteiner MP, Beauchamp J, Döbeli H, Hilpert H, Matile H, Prummer M, Schmidt A (2011) Bace2 is a β cell-enriched protease that regulates pancreatic β cell function and mass. *Cell metabolism* 14:365-377
64. Fader CM, Colombo MI (2009) Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 16:70-78
65. Feng T, Tammineni P, Agrawal C, Jeong YY, Cai Q (2017) Autophagy-mediated Regulation of BACE1 Protein Trafficking and Degradation. *J Biol Chem* 292:1679-1690
66. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y (2006) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The lancet* 366:2112-2117
67. Filser S, Ovsepian SV, Masana M, Blazquez-Llorca L, Brandt Elvang A, Volbracht C, Muller MB, Jung CK, Herms J (2015) Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions. *Biol Psychiatry* 77:729-739

68. Foltz IN, Lee JC, Young PR, Schrader JW (1997) Hemopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 activate the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272:3296-3301
69. Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, LaFerla FM, Taylor SM, Woodruff TM, Tenner AJ (2009) Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol* 183:1375-1383
70. Frackowiak R, Pozzilli C, Legg Nd, Du Boulay G, Marshall J, Lenzi G, Jones T (1981) Regional cerebral oxygen supply and utilization in dementia. A clinical and physiological study with oxygen-15 and positron tomography. *Brain: a journal of neurology* 104:753-778
71. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78:1039-1049
72. Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol* 164:719-725
73. Galvan V, Banwait S, Spilman P, Gorostiza OF, Peel A, Ataie M, Crippen D, Huang W, Sidhu G, Ichijo H (2007) Interaction of ASK1 and the β -amyloid precursor protein in a stress-signaling complex. *Neurobiology of disease* 28:65-75
74. Garden GA, La Spada AR (2012) Intercellular (mis)communication in neurodegenerative disease. *Neuron* 73:886-901
75. Ge YW, Maloney B, Sambamurti K, Lahiri DK (2004) Functional characterization of the 5' flanking region of the BACE gene: identification of a 91 bp fragment involved in basal level of BACE promoter expression. *FASEB J* 18:1037-1039
76. Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F (2002) β -Amyloid-Induced Inflammation and Cholinergic Hypofunction in the Rat Brain in Vivo: Involvement of the p38MAPK Pathway. *Neurobiology of Disease* 11:257-274
77. Giri M, Zhang M, Lu Y (2016) Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging* 11:665-681
78. Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A (2009) β -amyloid monomers are neuroprotective. *The Journal of neuroscience* 29:10582-10587
79. Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706
80. Goebbels S, Bormuth I, Bode U, Hermanson O, Schwab MH, Nave KA (2006) Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 44:611-621
81. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *The EMBO Journal* 16:3563-3571
82. Goldstein DM, Kuglstat A, Lou Y, Soth MJ (2010) Selective p38alpha inhibitors clinically evaluated for the treatment of chronic inflammatory disorders. *J Med Chem* 53:2345-2353
83. Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006) Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimers Dis* 9:1-12

84. Griffin W, Stanley L, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot L, White C, Araoz C (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:7611-7615
85. Griffin WST, Sheng JG, Roberts GW, Mrak RE (1995) Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 54:276-281
86. Grimm MO, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdoerfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B (2011) Docosahexaenoic acid reduces amyloid β production via multiple pleiotropic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 286:14028-14039
87. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089
88. Guo F, He X-B, Li S, Le W (2016) A Central Role for Phosphorylated p38 α in Linking Proteasome Inhibition-Induced Apoptosis and Autophagy. *Molecular Neurobiology*:1-13
89. Guo Q, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H (2012) APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell research* 22:78-89
90. Guzowski JF, McGaugh JL (1997) Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:2693-2698
91. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a006270
92. Hale KK, Trollinger D, Rihanek M, Manthey CL (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase α , β , γ , and δ in inflammatory cell lineages. *The Journal of Immunology* 162:4246-4252
93. Han J, Lee J, Bibbs L, Ulevitch R (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.
94. Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62
95. Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, Bennett BD, Kahn S, Ross S, Burgess T (2000) Characterization of Alzheimer's β -secretase protein BACE a pepsin family member with unusual properties. *Journal of Biological Chemistry* 275:21099-21106
96. Hao W, Liu Y, Liu S, Walter S, Grimm MO, Kiliaan AJ, Penke B, Hartmann T, Rube CE, Menger MD, Fassbender K (2011) Myeloid differentiation factor 88-deficient bone marrow cells improve Alzheimer's disease-related symptoms and pathology. *Brain* 134:278-292
97. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889
98. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184
99. Hashimoto Y, Niikura T, Chiba T, Tsukamoto E, Kadowaki H, Nishitoh H, Yamagishi Y, Ishizaka M, Yamada M, Nawa M (2003) The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid- β protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306:889-902

100. He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y (2007) Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol* 178:829-841
101. He X, Li F, Chang W-P, Tang J (2005) GGA proteins mediate the recycling pathway of memapsin 2 (BACE). *Journal of Biological Chemistry* 280:11696-11703
102. Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T (2001) Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60:906-916
103. Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR (1999a) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *Journal of neurochemistry* 72:2053-2058
104. Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, Pye QN, Stewart CA, Geddes J, Markesbery WR, Patel E, Johnson GV, Bing G (1999b) p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72:2053-2058
105. Hernandez F, Avila J (2007) Tauopathies. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:2219-2233
106. Hitt BD, Jaramillo TC, Chetkovich DM, Vassar R (2010) BACE1-/-mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Molecular neurodegeneration* 5:1
107. Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, Roessner A, Malfertheiner P, Naumann M (2004) Inhibition of p38 MAP kinase-and RICK/NF- κ B-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *The FASEB Journal* 18:1550-1552
108. Hong M, Lee VM-Y (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *Journal of Biological Chemistry* 272:19547-19553
109. Hu X, Zhou X, He W, Yang J, Xiong W, Wong P, Wilson CG, Yan R (2010) BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience* 30:8819-8829
110. Huang S, Jiang Y, Li Z, Nishida E, Mathias P, Lin S, Ulevitch RJ, Nemerow GR, Han J (1997) Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity* 6:739-749
111. Hussain I, Hawkins J, Harrison D, Hille C, Wayne G, Cutler L, Buck T, Walter D, Demont E, Howes C (2007) Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases β -cleavage of amyloid precursor protein and amyloid- β production in vivo. *Journal of neurochemistry* 100:802-809
112. Invitrogen (2010a) BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kits- User Manual. Version F:60-61
113. Invitrogen (2010b) pCEP4- User Manual. 0000615:8
114. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology* 9:119-128
115. Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, Xu G, Margevicius D, Karlo JC, Sousa GL, Coteleur AC, Butovsky O, Bekris L, Staugaitis SM, Leverenz JB, Pimplikar SW, Landreth GE, Howell GR, Ransohoff RM, Lamb BT (2015) TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 212:287-295

116. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *Journal of Biological Chemistry* 271:17920-17926
117. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . *Journal of Biological Chemistry* 272:30122-30128
118. Jo C, Gundemir S, Pritchard S, Jin YN, Rahman I, Johnson GV (2014) Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun* 5:3496
119. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96-99
120. Kaden D, Munter L-M, Joshi M, Treiber C, Weise C, Bethge T, Voigt P, Schaefer M, Beyermann M, Reif B (2008) Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect β -secretase cleavage of APP. *Journal of Biological Chemistry* 283:7271-7279
121. Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Ehehalt R, Verkade P, Drechsel D, Simons K (2005) Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 280:36815-36823
122. Kamal A, Almenar-Queral A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing β -secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414:643-648
123. Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R (2013) The Alzheimer's beta-secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol* 126:329-352
124. Kang EL, Biscaro B, Piazza F, Tesco G (2012) BACE1 protein endocytosis and trafficking are differentially regulated by ubiquitination at lysine 501 and the Di-leucine motif in the carboxyl terminus. *Journal of Biological Chemistry* 287:42867-42880
125. Kang EL, Cameron AN, Piazza F, Walker KR, Tesco G (2010) Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *Journal of Biological Chemistry* 285:24108-24119
126. Karaca I, Tamboli IY, Glebov K, Richter J, Fell LH, Grimm MO, Haupenthal VJ, Hartmann T, Gräler MH, van Echten-Deckert G (2014) Deficiency of sphingosine-1-phosphate lyase impairs lysosomal metabolism of the amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* 289:16761-16772
127. Kato Y, Misra S, Puertollano R, Hurley JH, Bonifacino JS (2002) Phosphoregulation of sorting signal-VHS domain interactions by a direct electrostatic mechanism. *Nat Struct Biol* 9:532-536
128. Keil E, Höcker R, Schuster M, Essmann F, Ueffing N, Hoffman B, Liebermann D, Pfeffer K, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2013a) Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death & Differentiation* 20:321-332
129. Keil E, Hocker R, Schuster M, Essmann F, Ueffing N, Hoffman B, Liebermann DA, Pfeffer K, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2013b) Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death Differ* 20:321-332
130. Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:396-405
131. Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3:452-460

132. Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of cell science* 116:3339-3346
133. Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:8843-8853
134. Kizuka Y, Kitazume S, Fujinawa R, Saito T, Iwata N, Saido TC, Nakano M, Yamaguchi Y, Hashimoto Y, Staufenbiel M, Hatsuta H, Murayama S, Manya H, Endo T, Taniguchi N (2015a) An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 7:175-189
135. Kizuka Y, Kitazume S, Sato K, Taniguchi N (2015b) Clec4g (LSEctin) interacts with BACE1 and suppresses Abeta generation. *FEBS Lett* 589:1418-1422
136. Kizuka Y, Nakano M, Kitazume S, Saito T, Saido TC, Taniguchi N (2016) Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. *Biochem J* 473:21-30
137. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC (2008) Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4:849-850
138. Klyubin I, Cullen WK, Hu N-W, Rowan MJ (2012) Alzheimer's disease A β assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Molecular brain* 5:1
139. Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268:24374-24384
140. Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8856-8860
141. Kuhn PH, Koroniak K, Hogg S, Colombo A, Zeitschel U, Willem M, Volbracht C, Schepers U, Imhof A, Hoffmeister A, Haass C, Rossner S, Brase S, Lichtenthaler SF (2012) Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J* 31:3157-3168
142. Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, Konig S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M, Heneka MT (2011) Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron* 71:833-844
143. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227:680-685
144. Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang H-C, Xu G, Koliatsos VE (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *The Journal of neuroscience* 25:11693-11709
145. Lau T-L, Ambroggio EE, Tew DJ, Cappai R, Masters CL, Fidelio GD, Barnham KJ, Separovic F (2006) Amyloid- β peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *Journal of molecular biology* 356:759-770
146. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Keys JR, Strickler JE (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.
147. Lee S, Xu G, Jay TR, Bhatta S, Kim KW, Jung S, Landreth GE, Ransohoff RM, Lamb BT (2014) Opposing effects of membrane-anchored CX3CL1 on amyloid and tau pathologies via the p38 MAPK pathway. *J Neurosci* 34:12538-12546

148. Lee SH, Park J, Che Y, Han PL, Lee JK (2000a) Constitutive activity and differential localization of p38 α and p38 β MAPKs in adult mouse brain. *Journal of neuroscience research* 60:623-631
149. Lee SJ, Drabik K, Van Wagoner NJ, Lee S, Choi C, Dong Y, Benveniste EN (2000b) ICAM-1-induced expression of proinflammatory cytokines in astrocytes: involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of Immunology* 165:4658-4666
150. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu C-e, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977
151. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots G, Luyendijk W, Frangione B (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248:1124-1126
152. Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011a) Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 31:6627-6638
153. Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011b) Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience* 31:6627-6638
154. Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS (2003) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* 23:1605-1611
155. Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J (1996) The primary structure of p38 γ : a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochemical and biophysical research communications* 228:334-340
156. LifeTechnologies (2014) GeneArt® CRISPR Nuclease Vector Kit- User Manual. C.0:13
157. Lim J-E, Kou J, Song M, Pattanayak A, Jin J, Lalonde R, Fukuchi K-i (2011) MyD88 deficiency ameliorates β -amyloidosis in an animal model of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 179:1095-1103
158. Litsky JM, Johnson GV (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267:1563-1568
159. Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1820-1832
160. Liu RQ, Zhou QH, Ji SR, Zhou Q, Feng D, Wu Y, Sui SF (2010) Membrane localization of beta-amyloid 1-42 in lysosomes: a possible mechanism for lysosome labilization. *J Biol Chem* 285:19986-19996
161. Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, Rube CE, Walter J, Heneka MT, Hartmann T, Menger MD, Fassbender K (2012) TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol* 188:1098-1107
162. Liu Y, Liu X, Hao W, Decker Y, Schomburg R, Fulop L, Pasparakis M, Menger MD, Fassbender K (2014) IKK β deficiency in myeloid cells ameliorates Alzheimer's disease-related symptoms and pathology. *J Neurosci* 34:12982-12999
163. Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34:371-385
164. Lu DC, Shaked GM, Masliah E, Bredesen DE, Koo EH (2003) Amyloid β protein toxicity mediated by the formation of amyloid- β protein precursor complexes. *Annals of neurology* 54:781-789

165. Luo Y (2003) BACE1 (β -secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiology of Disease* 14:81-88
166. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience* 13:133-140
167. Malcolm KC, Worthen GS (2003) Lipopolysaccharide stimulates p38-dependent induction of antiviral genes in neutrophils independently of paracrine factors. *Journal of Biological Chemistry* 278:15693-15701
168. Maphis N, Jiang S, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Roy SM, Van Eldik LJ, Watterson DM, Lamb BT, Bhaskar K (2016) Selective suppression of the alpha isoform of p38 MAPK rescues late-stage tau pathology. *Alzheimers Res Ther* 8:54
169. Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT, Bhaskar K (2015) Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* 138:1738-1755
170. Mark RJ, Ashford JW, Goodman Y, Mattson MP (1995) Anticonvulsants attenuate amyloid β -peptide neurotoxicity, Ca^{2+} deregulation, and cytoskeletal pathology. *Neurobiology of aging* 16:187-198
171. Matsuzawa T, Kim BH, Shenoy AR, Kamitani S, Miyake M, Macmicking JD (2012) IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol* 189:813-818
172. May PC, Dean RA, Lowe SL, Martenyi F, Sheehan SM, Boggs LN, Monk SA, Mathes BM, Mergott DJ, Watson BM (2011) Robust central reduction of amyloid- β in humans with an orally available, non-peptidic β -secretase inhibitor. *The Journal of neuroscience* 31:16507-16516
173. McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M (2007) Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry* 282:26326-26334
174. McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1285
175. McGeer P, McGeer E (1996) Anti-Inflammatory Drugs in the Fight against Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 777:213-220
176. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995) Activation of microglial cells by β -amyloid protein and interferon- γ . *Nature* 374:647-650
177. Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720-724
178. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* 273:33889-33892
179. Moyzis AG, Sadoshima J, Gustafsson ÅB (2015) Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 308:H183-H192
180. Mucke L, Selkoe DJ (2012) Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006338
181. Munoz L, Ammit AJ (2010) Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 58:561-568

182. Munoz L, Ralay Ranaivo H, Roy SM, Hu W, Craft JM, McNamara LK, Chico LW, Van Eldik LJ, Watterson DM (2007) A novel p38 α MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neuroinflammation* 4:21
183. Murer M, Boissiere F, Yan Q, Hunot S, Villares J, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R (1999) An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88:1015-1032
184. Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang H-Y (2003) Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain research* 971:197-209
185. Narisawa-Saito M, Wakabayashi K, Tsuji S, Takahashi H, Nawa H (1996) Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7:2925-2928
186. Nishida K, Yamaguchi O, Hirotsu S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G, Uno Y, Kashiwase K, Taniike M, Nakai A, Matsumura Y, Miyazaki J, Sudo T, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Chien KR, Takeda J, Hori M, Otsu K (2004) p38 α mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol* 24:10611-10620
187. Nixon RA (2013) The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 19:983-997
188. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:113-122
189. Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoaka Y, Ahljanian M, Lau LF, Duff K (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38:555-565
190. Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004) Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43:321-332
191. Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF (2006) Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *European Journal of Neuroscience* 23:251-260
192. Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007) BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 26:134-145
193. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, Vassar R, Disterhoft JF (2004) BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* 41:27-33
194. Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC (2002) Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease β -Amyloid Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂. *Journal of Biological Chemistry* 277:40302-40308
195. Pandey P, Raingeaud J, Kaneki M, Weichselbaum R, Davis RJ, Kufe D, Kharbanda S (1996) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by c-Abl-dependent and-independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 271:23775-23779
196. Parr C, Carzaniga R, Gentleman SM, Van Leuven F, Walter J, Sastre M (2012) Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid-beta precursor protein. *Mol Cell Biol* 32:4410-4418

197. Pastorino L, Ikin AF, Nairn AC, Pursnani A, Buxbaum JD (2002) The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A β . *Molecular and Cellular Neuroscience* 19:175-185
198. Peel AL, Sorscher N, Kim JY, Galvan V, Chen S, Bredesen DE (2004) Tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine* 5:205-218
199. Pei J-J, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (2001) Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 3:41-48
200. Peric A, Annaert W (2015) Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol* 129:363-381
201. Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Bergmann K, Gibson PH, Perry RH (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *BMJ* 2:1457-1459
202. Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C (2003) Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75:651-659
203. Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramie GR, Johnson SA, Winslow JW (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7:695-702
204. Picchioni D, Reith RM, Nadel JL, Smith CB (2014) Sleep, plasticity and the pathophysiology of neurodevelopmental disorders: the potential roles of protein synthesis and other cellular processes. *Brain Sci* 4:150-201
205. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 118:2190-2199
206. Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA (2003) The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of neuroscience* 23:5531-5535
207. Polito VA, Li H, Martini-Stoica H, Wang B, Yang L, Xu Y, Swartzlander DB, Palmieri M, di Ronza A, Lee VM, Sardiello M, Ballabio A, Zheng H (2014) Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Mol Med* 6:1142-1160
208. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, Herms J (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience* 26:7212-7221
209. Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Mechanisms of disease. *N Engl J Med* 362:329-344
210. Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004) ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25:641-650
211. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7:940-946
212. Rajendran L, Schneider A, Schlechtingen G, Weidlich S, Ries J, Braxmeier T, Schwille P, Schulz JB, Schroeder C, Simons M (2008) Efficient inhibition of the Alzheimer's disease β -secretase by membrane targeting. *Science* 320:520-523
213. Raoul C, Estévez AG, Nishimune H, Cleveland DW, Henderson CE, Haase G, Pettmann B (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas: potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron* 35:1067-1083

214. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE (2009) CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A β -stimulated microglial activation. *The Journal of neuroscience* 29:11982-11992
215. Reynolds CH, Nebreda AR, Gibb GM, Utton MA, Anderton BH (1997) Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J Neurochem* 69:191-198
216. Rochin L, Hurbain I, Serneels L, Fort C, Watt B, Leblanc P, Marks MS, De Strooper B, Raposo G, van Niel G (2013) BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:10658-10663
217. Rogaev E, Sherrington R, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778
218. Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nature genetics* 39:168-177
219. Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews* 68:320-344
220. Roy SM, Grum-Tokars VL, Schavocky JP, Saeed F, Staniszewski A, Teich AF, Arancio O, Bachstetter AD, Webster SJ, Van Eldik LJ, Minasov G, Anderson WF, Pelletier JC, Watterson DM (2015) Targeting human central nervous system protein kinases: An isoform selective p38 α MAPK inhibitor that attenuates disease progression in Alzheimer's disease mouse models. *ACS Chem Neurosci* 6:666-680
221. Rupp NJ, Wegenast-Braun BM, Radde R, Calhoun ME, Jucker M (2011) Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPPS1 transgenic mice. *Neurobiology of aging* 32:2324. e2321-2324. e2326
222. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC (2014) Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 17:661-663
223. Sasaki A, Yamaguchi H, Ogawa A, Sugihara S, Nakazato Y (1997) Microglial activation in early stages of amyloid β protein deposition. *Acta neuropathologica* 94:316-322
224. Sastre M, Dewachter I, Rossner S, Bogdanovic N, Rosen E, Borghgraef P, Evert BO, Dumitrescu-Ozimek L, Thal DR, Landreth G, Walter J, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPAR γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:443-448
225. Savage MJ, Lin Y-G, Ciallella JR, Flood DG, Scott RW (2002) Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition. *The Journal of neuroscience* 22:3376-3385
226. Schafer DP, Stevens B (2015) Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7:a020545
227. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G (2000) Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43:2501-2512
228. Scheuermann S, Hambsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* 276:33923-33929

229. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C (2003) Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of neuroscience* 23:7084-7092
230. Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998) Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 357:299-309
231. Sepulveda FJ, Parodi J, Peoples RW, Opazo C, Aguayo LG (2010) Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* 5:e11820
232. Serneels L, Van Biervliet J, Craessaerts K, Dejaegere T, Horre K, Van Houtvin T, Esselmann H, Paul S, Schafer MK, Berezovska O, Hyman BT, Sprangers B, Sciot R, Moons L, Jucker M, Yang Z, May PC, Karran E, Wiltfang J, D'Hooge R, De Strooper B (2009) gamma-Secretase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science* 324:639-642
233. Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, Jing N (2008) Hydrogen peroxide promotes A β production through JNK-dependent activation of γ -secretase. *Journal of Biological Chemistry* 283:17721-17730
234. Sherrington R (1995) Three genes for Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760
235. Shimshek DR, Jacobson LH, Kolly C, Zamurovic N, Balavenkatraman KK, Morawiec L, Kreutzer R, Schelle J, Jucker M, Bertschi B (2016) Pharmacological BACE1 and BACE2 inhibition induces hair depigmentation by inhibiting PMEL17 processing in mice. *Scientific reports* 6
236. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, Wilkins AD, Sun Q, Pallauf K, MacDuff D (2013) Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* 494:201-206
237. Simpson J, Ince P, Lace G, Forster G, Shaw P, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton S (2010) Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of aging* 31:578-590
238. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402:537-540
239. Small GW, Rabins PV, Barry PP, Buckholtz NS, DeKosky ST, Ferris SH, Finkel SI, Gwyther LP, Khachaturian ZS, Lebowitz BD (1997) Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders: consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *Jama* 278:1363-1371
240. Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *The EMBO journal* 24:3624-3634
241. Song W-J, Son M-Y, Lee H-W, Seo H, Kim JH, Chung S-H (2015) Enhancement of BACE1 activity by p25/cdk5-mediated phosphorylation in Alzheimer's disease. *PloS one* 10:e0136950
242. Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Brück W, Jellinger K, Lassmann H (1999) Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease: evidence for apoptotic cell death. *The American journal of pathology* 155:1459-1466
243. Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2529-2533
244. Suh J, Choi SH, Romano DM, Gannon MA, Lesinski AN, Kim DY, Tanzi RE (2013) ADAM10 missense mutations potentiate β -amyloid accumulation by impairing prodomain chaperone function. *Neuron* 80:385-401

245. Sun A (2003) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Experimental Neurology* 183:394-405
246. Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G (2003a) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* 183:394-405
247. Sun A, Liu M, Nguyen XV, Bing G (2003b) P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Experimental neurology* 183:394-405
248. Taguchi T, Akimaru K, Yamasaki M, Ryu S, Miyamoto E, Takano Y, Sato A (2000) Isolation of highly purified rat cerebral lysosomes using percoll gradients with a variety of calcium concentrations. *Environ Health Prev Med* 4:217-220
249. Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Y, Imai K (2000) p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *The EMBO journal* 19:6517-6526
250. Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998) Protein phosphatase 2C α inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *The EMBO journal* 17:4744-4752
251. Tamagno E, Guglielmotto M, Giliberto L, Vitali A, Borghi R, Autelli R, Danni O, Tabaton M (2009) JNK and ERK1/2 pathways have a dual opposite effect on the expression of BACE1. *Neurobiol Aging* 30:1563-1573
252. Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith M (2005) β -Site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of neurochemistry* 92:628-636
253. Tan J, Evin G (2012) Beta-site APP-cleaving enzyme 1 trafficking and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurochem* 120:869-880
254. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Ciarati S, Cohen P, Comb M (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO journal* 15:4629
255. Terry AV, Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306:821-827
256. Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang S-H, Zhong Z, Shen Y (2007) Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances β -secretase activity. *Neuron* 54:721-737
257. Tong L, Pav S, White DM, Rogers S, Crane KM, Cywin CL, Brown ML, Pargellis CA (1997) A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nature structural biology* 4:311-316
258. Turner AJ, Fisk L, Nalivaeva NN (2004) Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1035:1-20
259. Uy R, Wold F (1977) Posttranslational covalent modification of proteins. *Science* 198:890-896
260. Vassar R (2002) β -Secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Advanced drug delivery reviews* 54:1589-1602
261. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R (1999) β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *science* 286:735-741
262. Vassar R, Kuhn PH, Haass C, Kennedy ME, Rajendran L, Wong PC, Lichtenthaler SF (2014) Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J Neurochem* 130:4-28
263. Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh C-Y, Rodriguez JJ (2010) Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 7:399-412

264. von Arnim CA, Spoelgen R, Peltan ID, Deng M, Courchesne S, Koker M, Matsui T, Kowa H, Lichtenthaler SF, Irizarry MC (2006) GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. *The Journal of neuroscience* 26:9913-9922
265. Wahle T, Prager K, Raffler N, Haass C, Famulok M, Walter J (2005) GGA proteins regulate retrograde transport of BACE1 from endosomes to the trans-Golgi network. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29:453-461
266. Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2001) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276:14634-14641
267. Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schüffer W (2007) Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry* 20:947-956
268. Wang J, Yuan Y, Zhou Y, Guo L, Zhang L, Kuai X, Deng B, Pan Z, Li D, He F (2008) Protein interaction data set highlighted with human Ras-MAPK/PI3K signaling pathways. *Journal of proteome research* 7:3879-3889
269. Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:10758-10762
270. Webber JL, Tooze SA (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J* 29:27-40
271. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862
272. Weninger SC, Yankner BA (2001) Inflammation and Alzheimer disease: The good, the bad, and the ugly. *Nature Medicine* 7:527-528
273. Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF- κ B dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *The FASEB journal* 17:500-502
274. Wortmann M (2012) Dementia: a global health priority-highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimers Res Ther* 4:40
275. Wu HY, Mao XF, Fan H, Wang YX (2017) p38beta MAPK signaling mediates exenatide-stimulated microglial beta-endorphin expression. *Mol Pharmacol*
276. Wu J, Petralia RS, Kurushima H, Patel H, Jung M-y, Volk L, Chowdhury S, Shepherd JD, Dehoff M, Li Y (2011) Arc/Arg3. 1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β -amyloid generation. *Cell* 147:615-628
277. Wyss-Coray T, Rogers J (2012) Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006346
278. Xie J, Brayne C, Matthews FE (2008) Survival times in people with dementia: analysis from population based cohort study with 14 year follow-up. *Bmj* 336:258-262
279. Xie Z, Smith CJ, Van Eldik LJ (2004) Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia* 45:170-179
280. Yamaguchi S, Meguro K, Itoh M, Hayasaka C, Shimada M, Yamazaki H, Yamadori A (1997) Decreased cortical glucose metabolism correlates with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease as shown by MRI and PET. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 62:596-600
281. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashler JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* 402:533-537

282. Yan R, Fan Q, Zhou J, Vassar R (2016) Inhibiting BACE1 to reverse synaptic dysfunctions in Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*
283. Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 134:258-277
284. Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3-4
285. Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53:337-351
286. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171:87-98
287. Yun HJ, Park J, Ho DH, Kim H, Kim C-H, Oh H, Ga I, Seo H, Chang S, Son I (2013) LRRK2 phosphorylates Snapin and inhibits interaction of Snapin with SNAP-25. *Experimental & molecular medicine* 45:e36
288. Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11-18
289. Zhang H, Ma Q, Zhang Yw, Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *Journal of neurochemistry* 120:9-21
290. Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *Journal of Biological Chemistry* 270:23934-23936
291. Zhong W, Zhu H, Sheng F, Tian Y, Zhou J, Chen Y, Li S, Lin J (2014) Activation of the MAPK11/12/13/14 (p38 MAPK) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in HeLa cells. *Autophagy* 10:1285-1300
292. Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA (2000) Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:880-888

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dynamik der Biomarker über den Verlauf der AD-Stadien	11
Abbildung 2: Nicht Amyloidogener und amyloidogener Sekretasenweg	13
Abbildung 3: Stabilität von BACE nach Glykosylierung	17
Abbildung 4: Ablauf des Autophagieprozesses	19
Abbildung 5: p38-MAPK Signalweg.	22
Abbildung 6: Multiple Beteiligung von p38-MAPK an der AD-Pathogenese.....	24
Abbildung 7: Transfektionsvektoren.....	34
Abbildung 8: CRISPR/Cas9 Methode.	44
Abbildung 9: Deletion der neuronalen p38 α -MAPK	72
Abbildung 10: p38 α -MAPK ko reduziert den zerebralen A β -Gehalt in APP/PS1 ^{tg} Mäusen.....	73
Abbildung 11: Reduzierte BACE-Aktivität und -Proteinmenge nach p38 α -MAPK ko.....	75
Abbildung 12: kd von p38 α -MAPK reduziert Proteinlevel und Aktivität von BACE.....	78
Abbildung 13: p38 α -MAPK kd fördert lysosomale Degradation von BACE.....	80
Abbildung 14: p38 α -MAPK kd hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von BACE.....	81
Abbildung 15: Deletion von p38 α -MAPK erhöht Autophagie in <i>vitro</i> und in <i>vivo</i>	83
Abbildung 16: Inhibition der Autophagie verhindert BACE Reduktion nach p38 α -MAPK kd.....	85
Abbildung 17: Verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung in 9 Monate alten APP/PS1 ^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen.	87
Abbildung 18: p38 α -MAPK ko erhöht synaptische Markerproteine in 9 Monate alten APP/PS1 ^{tg} Mäusen	89
Abbildung 19: Keine apoptotischen Nebeneffekte in APP/PS1 ^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen.....	90
Abbildung 20: p38 α -MAPK ko reduziert Mikroglia und Neuroinflammation und ist assoziiert mit erhöhter Genexpression von Wachstumsfaktoren in APP/PS1 ^{tg} Mäusen.....	92
Abbildung 21: Unverändertes BACE Proteinlevel und Sekretasen-Aktivität nach ATG5 ko.	93
Abbildung 22: Negative Korrelation zwischen BACE- und ATG5-Proteinlevel in neuronaler Primärkultur.	94
Abbildung 23: Vermindertes GSLII Proteinlevel und MGAT3 Phosphorylierung nach p38 α -MAPK kd.....	96
Abbildung 24: Vermindertes BACE Proteinlevel nach MGAT3 kd.....	98
Abbildung 25: Erhöhtes BACE Proteinlevel in MGAT3 kd-T2 nach p38 α -MAPK kd.	100
Abbildung 26: Autophagieinhibition erhöht BACE Proteinlevel nach MGAT3 kd.	101
Abbildung 27: Verbesserte Lern- und Gedächtnisleistung in Tau ^{tg} p38 α -MAPK ko Mäusen. ...	102
Abbildung 28: p38 α -MAPK ko erhöht synaptische Markerproteine in Tau ^{tg} Mäusen.	103
Abbildung 29: p38 α -MAPK ko reduziert Proteinlevel von pTAU in Tau ^{tg} Mäusen.	104
Abbildung 30: Fokus der Forschung ist die Aufklärung der pathogenen Rolle der neuronalen p38 α im AD-Mausmodell	118
Abbildung 31: Expression von EmGFP nach Transfektion der p38 α -MAPK Konstrukte.....	144
Abbildung 32: Expression von DsRed und EmGFP nach Transfektion der MGAT3 kd bzw. p38 α -MAPK kd Konstrukte.	145

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	26
Tabelle 2: Hilfsmittel	27
Tabelle 3: Chemikalien.....	28
Tabelle 4: Lösungen und Puffer	31
Tabelle 5: Kits.....	32
Tabelle 6: Für <i>Western blot</i> verwendete Primärantikörper	32
Tabelle 7: Für <i>Western blot</i> verwendete Sekundärantikörper	33
Tabelle 8: Für Immunzyto- und Immunhistochemie (IHC) verwendete Primärantikörper.....	33
Tabelle 9: Für Immunzytochemie und IHC verwendete Sekundärantikörper	33
Tabelle 10: Primerpaare für die quantitative Real-Time-PCR mit SYBR [®] Green	33
Tabelle 11: Sequenzen der transfizierten Oligonukleotiden	35
Tabelle 12: Anlagerungs-Reaktion zur Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide.....	39
Tabelle 13: Ansatz des Ligationsreaktion	39
Tabelle 14: Ligationsansatz der CRISPR-Cas9-Technik.....	44
Tabelle 15: Zusammensetzung der angefertigten Tris-Glycin Gele (Menge für 2 Gele)	51
Tabelle 16: Reaktionsmix Sybr Green	58
Tabelle 17: Reaktionsprotokoll Sybr Green	59
Tabelle 18: Reaktionsmix TaqMan.....	59
Tabelle 19: Reaktionsprotokoll TaqMan.....	60

8 Kooperationen

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die hier vorgestellten Experimente selbstständig und ohne Hilfe durchgeführt.

Methode zur Abbildung	Arbeitsschritt	Durchführende Person/en
Abb.9 A; Abb.9 C	Quantitativer <i>Western blot</i> und Auswertung; Mikroskopie, Bildaufnahme	Dr. Xu Liu; Dr. Alex Liu
Abb.10	Quantitativer <i>Western blot</i>	In Kooperation mit Inge Tomic
Abb.13 D und E	Lysosomen Isolation und quantitativer <i>Western blot</i>	In Kooperation mit Dr. Yiren Qin
Abb.20 C und D	Messung der Sekretasen-Aktivität	In Kooperation mit Inge Tomic
Abb.21	Präparation der Primärkultur	In Kooperation mit Inge Tomic
Abb.25	Kognitivtest der Tau ^{tg} Mäuse	In Kooperation mit Dr. Yiren Qin
Allgemein	Genotypisierung aller verwendeten Tiere	Dr. Alex Liu, Rebecca Lancaster und Andrea Schottek
Allgemein	Design aller eingesetzten Primer und ds oligos,	Dr. Alex Liu
Allgemein	Tamoxifeninjektion intraperitoneal <i>in vivo</i>	Dr. Alex Liu
Allgemein	Sequenzierung der klonierten Plasmide	Seqlab Sequence Laboratories

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
A β 40 bzw. 42	Amyloid beta 1-40 bzw. 1-42
AD	Alzheimer-Krankheit (eng. <i>Alzheimer's disease</i>)
ADAM	eng. <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ANOVA	eng. <i>analysis of variance</i>
APP	Amyloides Vorläuferprotein (eng. <i>Amyloid precursor protein</i>)
APLP	eng. <i>Aβ precursor like protein</i>
Arc	eng. <i>activity-regulated cytoskeleton-associated Protein</i>
ASK1	eng. <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATG5	eng. <i>autophagy related gene 5</i>
BACE	eng. <i>beta-site APP cleaving enzyme</i>
BDNF	eng. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	eng. <i>bovine serum albumin</i>
Cas	CRISPR assoziiert
Camk2 α	eng. <i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha</i>
CCL-2	Chemokin (C-C Motif) Ligand 2
CD	eng. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CNTF	eng. <i>ciliary neurotrophic factor</i>
COIP	Co-Immunopräzipitation
Cre	eng. <i>causes recombination</i>
CREB	eng. <i>CAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	eng. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
cRNA	CRISPR RNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit eng. <i>cerebrospinal fluid</i>
Ct	eng. <i>cycle threshold</i>
ct	eng. <i>control</i>
CTF	COOH-terminales Fragment
CTF β	C-terminales β -Sekretase Fragment
Cyanin	Cy
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
d ₂ H ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	eng. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DN	Dominant negativ
DNA	eng. <i>desoxyribonucleic acid</i>
ds oligos	Doppelsträngige Oligonukleotide
Ds	Discosoma sp

E	Embryonalwoche
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EmGFP	eng. <i>emerald green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERKs	eng. <i>extracellular signal-related kinases</i>
FA	eng. <i>formic acid</i>
FACS	eng. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	eng. <i>crystallisable fragment</i>
FCS	Fötales Kälberserum (eng. <i>fetal calf serum</i>)
FRET	eng. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GGA	eng. <i>golgi-localized gamma-containing ADP ribosylation factor-binding protein</i>
GlcNAc	eng. <i>bisecting N-acetylglucosamine</i>
Gly	Glycin
GSLII	Griffonia simplicifolia II
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HBSS	eng. <i>Hank's buffered salt solution</i>
HRP	eng. <i>horseradish peroxidase</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Iba1	eng. <i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IGF-1	eng. <i>insulin-like growth factor 1</i>
Ig(G)	Immunoglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin-1 β
NOS2	eng. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
JNKs	eng. <i>c-jun N-terminal kinases</i>
kd	eng. <i>knock down</i>
kDa	Kilo Dalton
ko	eng. <i>knock out</i>
LAMP	Lysosomen assoziiertes Membranprotein
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC3	eng. <i>microtubule-associated protein light chain 3</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotentierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCI	eng. <i>mild cognitive impairment</i>
MGAT3	eng. <i>mannosyl β-1,4-N Acetylglucosaminyltransferase</i>
MHC II	eng. <i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	microRNA
Minuten	min
(m)RNA	eng. <i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTor	eng. <i>mechanistic target of rapamycin</i>
Munc	eng. <i>mammalian uncoordinated</i>
NC	Nitrozellulose
NF κ B	eng. <i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>

NFT	eng. <i>neurofibrillary tangles</i>
NGF	eng. <i>nerve growth factor</i>
PAM	eng. <i>protospacer adjacent motif</i>
PBS(/T)	eng. <i>phosphate buffered saline (/Tween20)</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion (eng. <i>polymerase chain reaction</i>)
PerCP	eng. <i>peridinin chlorophyll</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
p-p38	phosphoryliertes p38
PRR	eng. <i>pattern recognition receptor</i>
PS1	Presenilin 1
PSD95	eng. <i>post synaptic density protein 95</i>
pTau	phosphoryliertes Tau
PTM	post-translationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Quadrant
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAB	eng. <i>reassembly buffer</i>
RAGE	eng. <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
rfp	eng. <i>red fluorescent protein</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitations-Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (eng. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	eng. <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sekunde/n	s
SNAP	eng. <i>synaptosomal-associated protein 25</i>
Stunden	h
SYN	eng. <i>synaptophysin</i>
Tab.	Tabelle
TBS(T)	eng. <i>Tris buffered saline (Tween 20)</i>
TdT	eng. <i>terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
TGF-β	eng. transforming growth factor-β
Theronin	Thr
TLR4	Toll-Like-Rezeptor 4
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNFR-1/-2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1/-2
tracrRNA	trans-aktivierende crRNA
transgen	tg
TUNEL	eng. <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Vorgesetzten, Kollegen, Freunden und meiner Familie meinen Dank ausdrücken.

Bei Herrn Prof. Dr.med. Klaus Faßbender bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung eines überaus interessanten und klinikrelevanten Themas, sowie die motivierenden Worte, große Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Kirchhoff danke ich für seine Unterstützung und für seine Bereitschaft, mich als Doktorandin zu betreuen.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. med. Alex Liu, der mich schon während meiner Bachelorarbeit für die Erforschung der neurodegenerativen Erkrankungen begeistert hat. Danke für die uneingeschränkte Hilfe, die Betreuung und das Vertrauen, welches mir entgegen gebracht wurde. Seine Unterstützung und der Freiraum für eigene Ideen, haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

感谢你做我的老师.

Frau PD Dr. med. Silke Walter danke ich für ihre moralische Unterstützung. Ihre unermüdliche Arbeitseinstellung war mir stets ein Vorbild und ständige Motivation. Ich bedanke mich bei all meinen Kollegen im Labor der AG Faßbender für das angenehme Arbeitsklima, sowie bei allen Kooperationspartnern für ihre Hilfe. Insbesondere, möchte ich dabei Marwan Chami, Xu Liu und Qin Yiren für die Diskussionen und Kollegialität danken. Ein besonderes Dankeschön geht auch an Rebecca Lancaster, Andrea Schottek und Inge Tomic, die mir mit viel Erfahrung, Motivation, Verständnis und guter Laune bei dem Gelingen dieser Arbeit geholfen haben. Des Weiteren möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, für die finanzielle Unterstützung (LI 1725/2-1) danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die nie gefordert oder erwartet haben, sondern mich in meinen Entscheidungen unterstützen und ermutigen.

Oma, Anna, Eric und Timo danke ich für Alles. Ihr habt mich in meiner Arbeit bestärkt und mir oft den Rücken freigehalten.

Danke für eure Unterstützung!

11 Anhang

11.1 Mikroskopische Kontrolle der p38 α -MAPK Transfektion

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurde die erfolgreiche Transfektion der Konstrukte ct-kd, kd709 und kd509 in den SHSY5Y Zellen mikroskopisch bestätigt (Abb.31). Alle positiv-transfizierten Zellen exprimieren das grüne Fluoreszenzprotein EmGFP (Abb.31 AII, BII und CII).

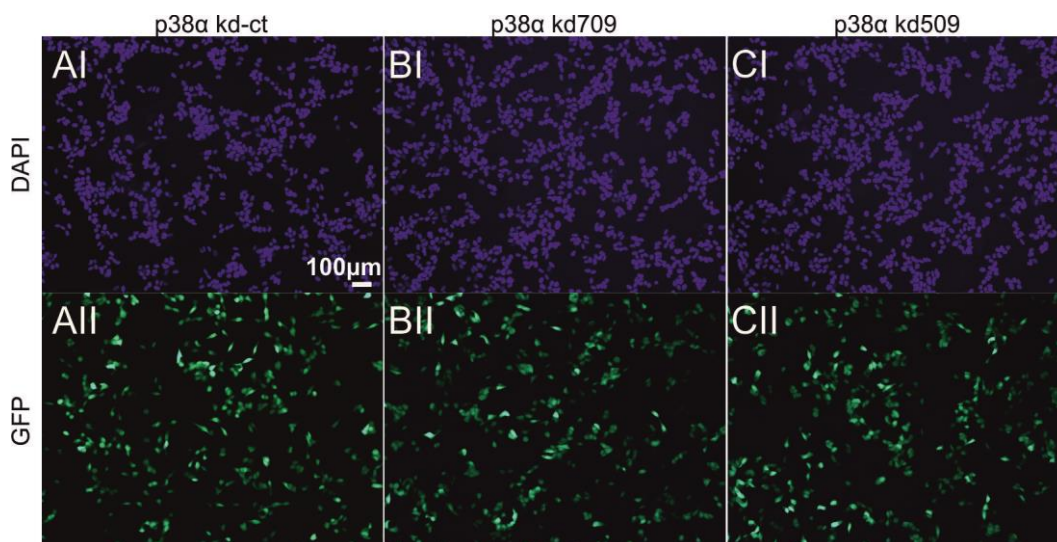


Abbildung 31: Expression von EmGFP nach Transfektion der p38 α -MAPK Konstrukte. Die fixierten SHSY5Y Zellen wurden in Medium mit DAPI eingedeckt (blaue Zellkernfluoreszenz in AI-CI) die Konstrukte kd-ct, kd709 und kd509 zur Etablierung der p38 α -MAPK kd Zelllinie, werden erfolgreich von den Zellen exprimiert (AII-CII).

11.2 Mikroskopische Kontrolle der MGAT3 Transfektion

Wie in Kapitel 3.16 beschrieben, wurde die erfolgreiche Transfektion der Konstrukte ct-kd, kd-T1 und kd-T2 in den SHSY5Y Zellen zur Etablierung der MGAT3 kd Zelllinie mikroskopisch bestätigt (Abb.32). Alle positiv-transfizierten Zellen exprimieren das rote Fluoreszenzprotein DsRed (Abb.32 AII, BII und CII). Zusätzlich exprimieren die SHSY5Y Zellen, bei positiver Co-Transfektion der Konstrukte ct-kd, kd709 und kd509 zur Etablierung des p38 α -MAPK kd, das grün fluoreszierende EmGFP (Abb.32. AIII, BIII und CIII).

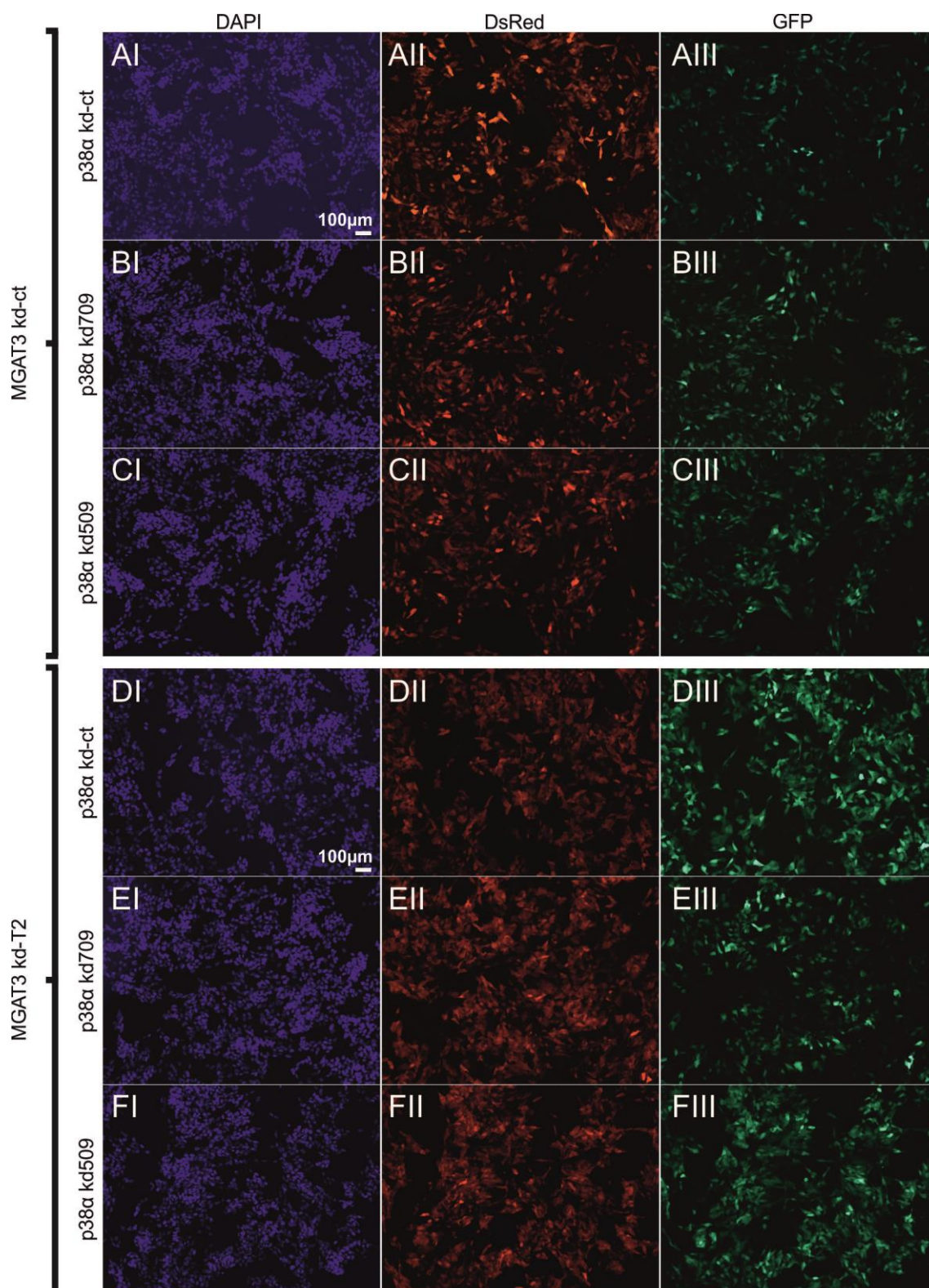


Abbildung 32: Expression von DsRed und EmGFP nach Transfektion der MGAT3 kd bzw. p38α-MAPK kd Konstrukte. Die fixierten SHSY5Y Zellen wurden in Medium mit DAPI eingedeckt (blaue Zellkernfluoreszenz in AI-FI) die MGAT3 kd Konstrukte kd-ct und kd-T2 (rote DsRed Fluoreszenz AII-FII), sowie die p38α-MAPK kd Konstrukte kd-ct, kd509 und kd709 werden beide gleichzeitig exprimiert (grüne GFP Fluoreszenz AIII-CIII).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, den

Laura Schnöder